

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin – Schwerpunkt Nephrologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**DIE ROLLE
KALZIUM-ABHÄNGIGER KALIUMKANÄLE
BEI UO-INDUZierter
NIERENFIBROSE**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Sautter aus Heidelberg

Marburg

2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 14. Oktober 2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Köhler
Korreferent: Herr Prof. Dr. Dominik Oliver

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER NIERE	1
1.2 TERMINALES NIERENVERSAGEN – EPIDEMIOLOGISCHE DATEN.....	1
1.3 NIERENFIBROSE.....	2
1.3.1 <i>Allgemeiner Pathomechanismus der Nierenfibrose</i>	2
1.3.2 <i>Herkunft der (Myo)fibroblasten</i>	4
1.3.2.1 Aktivierung residenter Fibroblasten.....	5
1.3.2.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition - EMT	6
1.3.2.3 Endotheliale-Mesenchymale Transition (EndMT)	6
1.3.2.4 Mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark	7
1.3.2.5 Periadventitielle Zellen (Perizyten, Perivaskuläre Fibroblasten).....	7
1.3.3 <i>Molekulare Mechanismen der Fibrose</i>	7
1.4 KALIUMKANÄLE IN DER NIERE.....	9
1.5 Ca^{2+} -AKTIVIERTE KALIUMKANÄLE	10
1.5.1 $K_{Ca3.1}$ (IKCa-Kanäle).....	11
1.5.1.1 Molekularer Aufbau des $K_{Ca3.1}$ -Kanals.....	11
1.5.1.2 Gewebeexpression und Eigenschaften des $K_{Ca3.1}$ -Kanals.....	12
1.5.1.3 Pharmakologie des $K_{Ca3.1}$ -Kanals.....	14
1.5.1.4 Bedeutung des $K_{Ca3.1}$ bei Proliferation und Migration von Zellen.....	16
1.5.2 $K_{Ca1.1}$ (BKCa-Kanäle).....	17
1.6 $K_{Ca2.x}$ (SKCa-KANÄLE)	19
1.7 ERFORSCHUNG PATHOPHYSIOLOGISCHER VORGÄNGE IN DER NIERE UNTER VERWENDUNG DES UUO-MODELLS SOWIE $K_{Ca3.1}$ -DEFIZIENTER MÄUSE	20
1.8 ZIELSETZUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE	23
2.1.1 <i>Chemikalien/ Pharmaka</i>	23
2.1.2 <i>Geräte/ Zubehör</i>	26
2.2 TIERE.....	27
2.2.1 <i>Genotypisierung der transgenen Mäuse</i>	28
2.3 UNILATERALE URETER OBSTRUKTION (UUO) – ERZEUGUNG EINER NIERENFIBROSE	31
2.3.1 <i>Operation</i>	31
2.3.2 <i>Nachsorge</i>	31

2.3.3	<i>Präparation des Untersuchungsmaterials</i>	32
2.4	HISTOLOGISCHE ANALYSE	33
2.4.1	<i>Histologische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials</i>	33
2.4.2	<i>Histologische Färbungen</i>	34
2.4.3	<i>Morphometrische Fibrosequantifizierung</i>	35
2.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DES ASMA- UND COLLAGEN I/III- EXPRESSIONSMUSTERS IN FIBROTISCHEM NIERENGeweBE	37
2.5.1	<i>Morphometrische Auswertung der Immunhistochemie</i>	41
2.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE DES K _{Ca} 3.1-EXPRESSIONSMUSTERS IN FIBROTISCHEM NIERENGeweBE	41
2.6.1	<i>mRNA-Isolation</i>	42
2.6.2	<i>cDNA-Transkription</i>	42
2.6.3	<i>Quantitative Taq-Man™-real time-RT-PCR</i>	43
2.7	NACHWEIS DES K _{Ca} 3.1-PROTEINS MITTELS WESTERN BLOT	48
2.8	PHARMAKOKINETIK VON TRAM-34 IN MÄUSEN MITTELS FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE/ MASSENSPEKTROMETRIE	49
2.9	STATISTISCHE ANALYSEN	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG DER MÄUSENIEREN NACH FIBROSEINDUKTION DURCH UUO IM KNOCK-OUT-MODELL	51
3.1.1	<i>Tubulointerstitielle Schädigung</i>	51
3.1.2	<i>Immunhistochemie der Fibrosemarker Kollagen I/III und αSMA</i>	53
3.1.3	<i>Morphometrische Analysen zu Differenzierungsgrad und Parenchyembreite</i> 57	
3.2	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG DER MÄUSENIEREN NACH FIBROSEINDUKTION BEI PHARMAKOLOGISCHER BLOCKADE VON K _{Ca} 3.1	59
3.2.1	<i>Pharmakokinetik von TRAM-34</i>	59
3.2.2	<i>Tubulointerstitielle Schädigung</i>	60
3.2.3	<i>Immunhistochemie der Fibrosemarker Kollagen I/III und αSMA</i>	62
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE DES K _{Ca} 3.1-EXPRESSIONSMUSTERS	66
3.3.1	<i>Genexpressionsmuster UUO-behandelter Wildtypen im Vergleich zur Kontrolle</i>	66
3.3.2	<i>Genexpressionsmuster UUO-behandelter K_{Ca}3.1 Knock-out Mäuse im Vergleich zu Wildtypen</i>	67
3.4	UNTERSUCHUNG DER K _{Ca} 3.1-TRANSLATION MITTELS WESTERN BLOT	69
4	DISKUSSION	71
4.1	HISTOLOGISCHE ANALYSE – EINFLUSS DES K _{Ca} 3.1-KANALS AUF DEN FIBROSIERUNGSPROZESS IN MÄUSENIEREN	71
4.1.1	<i>Untersuchungen im Knock-out-Modell</i>	71
4.1.2	<i>Pharmakotherapeutische Suppression der Nierenfibrose durch einen K_{Ca}3.1- Blocker</i> 72	
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE	74
4.2.1	<i>Korrelation von K_{Ca}3.1-Expression und Fibroseausmaß</i>	74

4.2.2	<i>K_{Ca}3.1-Expression in Korrelation zu profibrotischen Faktoren</i>	74
4.3	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER K _{Ca} 3.1-EXPRESSION IN DER NIERENFIBROSE	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/-INNEN	101
8	DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Aqua dest	destilliertes Wasser
bFGF-2	<i>basic fibroblast growth factor-2</i>
BK _{Ca} (K _{Ca} 1.1)	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit hoher Leitfähigkeit
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum Marburg
BMP-7	<i>bone morphogenic protein 7</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
CaM	Calmodulin
CBF-A	<i>CArg box-binding factor-A</i>
[Ca ²⁺] _{frei}	freie Kalzium-Konzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalzium-Konzentration
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLT	Clotrimazol = 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]- 1H-imidazol
Ct	<i>cycle of threshold</i> = Schwellenzyklus
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CTX	Charybdotoxin
CyP450	Cytochrom P450, Oxidoreduktase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCEBIO	5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3dihydro-2H-benzimidazol-2- one
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS I	Dehydrosoyasaponin I
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinon
EC	<i>endothelial cell(s)</i> , Endothelzelle

EC ₅₀	<i>hier</i> : Ca ²⁺ -Konzentration, bei der die Kanaloffenwahrscheinlichkeit halbmaximal ist
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>
Eö	mit Erdnussöl behandelte Gruppe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated</i> -Kinase
ESRD	<i>end stage renal disease</i> , terminals Nierenversagen
ET-1	Endothelin-1
EZR	Extrazellulärraum
FIK	I K _{Ca} -Kanal in Fibroblasten
FRET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
FSP-1	<i>fibroblast specific protein-1</i>
FTS-1	<i>fibroblast transcription site-1</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein zur Signaltransduktion
HCl	Salzsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HPF	<i>high power field</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei welcher der Kanalstrom halbmaximal geblockt ist
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IK _{Ca} (K _{Ca} 3.1)	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit
I-κB	<i>inhibitor of kappa B</i>
IL-1	Interleukin-1
i.p.	intraperitoneal

IP ₃	Inositol(1,4,5)-trisphosphat
ITX	Iberiotoxin
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
K ⁺	Kalium
K2p	K ⁺ -Kanal mit 2 Kanalporen
KAP-1	<i>KRAB-associated protein-1</i>
K _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal
KG	Körpergewicht
Ki-67	Proliferationsmarker
Kir	einwärts rektifizierender K ⁺ -Kanal
KO	Knock-out
Kv	spannungs-aktivierter K ⁺ -Kanal
LC	<i>liquid chromatography</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Signaltransduktionsweg mit p38)
MDCK-FC	<i>Madin-Darby canine kidney focus cells</i> (Tubulusepithelzellen)
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MET	<i>mesenchymal-to-epithelial transition</i>
MG	Masson-Goldner, Färbung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase)
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9 (Typ IV Kollagenase)
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NS1619	1-(2'-Hydroxy-5'-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2(3H) benzimidazon
5'NT	Ecto-5'-Nucleotidase

OP	Operation
OT	Objektträger
p38	p38-Signaltransduktionsweg (Apoptose)
PA	<i>plasminogen activator</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> , Färbung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpufferlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pS	pico Sievert
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i> , Proteinkinase (Signaltransduktion)
Ras	<i>rat sarcoma</i> , monomeres G-Protein (Signaltransduktion)
RhoA	<i>small GTPase</i> , Ras Familie (Signaltransduktion)
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Serine/Threonin Protein Kinase (Signaltransduktionsweg mit Rho)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sek	Sekunden
SK _{Ca} (K _{Ca2.x})	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit niedriger Leitfähigkeit
Smad-Proteine	Transkriptionsfaktoren zur Genregulation
Std	Stunden
TAE	Tris EDTA Acetat
TBM	<i>tubular basement membrane</i>

TBST	<i>Tris-buffered saline tween-20</i>
TEA	Tetraethylammonium
TGF β 1	<i>transforming growth factor β1</i>
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tr	mit TRAM-34 behandelte Gruppe
TRAM	Triarylmethan
TRAM-34	Triarylmethan-34 = 1- [(Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
UE	Untereinheit
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
UUO	<i>unilateral ureteral obstruction</i>
UV	Ultraviolett (Strahlung)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell(s)</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SKIZZE ZUR UMSTRITTENEN HERKUNFT DER MYOFIBROBLASTEN ALS MATRIXPRODUZIERENDE ZELLE. DIE ABBILDUNG WURDE MODIFIZIERT NACH GRANDE & LÓPEZ-NOVOA, 2009.	5
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG MOLEKULARER MECHANISMEN DER FIBROSE. ABGEBILDET IST EINE ÜBERSICHT EINIGER INTRAZELLULÄRER AUSWIRKUNGEN DES TGF β 1.	9
ABBILDUNG 3: MOLEKULARER AUFBAU DES K $_{Ca}$ 3.1-KANALS IN SCHEMATISCHER DARSTELLUNG. ABGEBILDET SIND DIE FÜR SEINE FUNKTIONSWEISE UND CHARAKTERISIERUNG WICHTIGEN ELEMENTE. AUF GANZ ÄHNLICHE WEISE IST AUCH DER AUFBAU DES VERWANDTEN K $_{Ca}$ 2.x-KANALS.	13
ABBILDUNG 4: INTERAKTIONSMODELL ZUR VERANSCHAULICHUNG DER FUNKTIONSWEISE VON CALMODULIN MIT DEN C-TERMINALEN ENDEN DES K $_{Ca}$ 3.1-KANALS.	14
ABBILDUNG 5: ABGEBILDET SIND DIE STRUKTURFORMELN VON ZWEI K $_{Ca}$ 3.1-BLOCKERN DER TRIARYLMETHAN-KLASSE. DAS ANTIMYKOTIKUM CLOTRIMAZOL (CLT) INTERAGIERT GLEICHZEITIG MIT DEM CYTOCHROM-P450-SYSTEM, DAS VERWANDTE MOLEKÜL TRAM-34 ZEICHNET SICH DURCH UNABHÄNGIGKEIT VON CYP450 SOWIE HOHE SELEKTIVITÄT UND EFFIZIENZ AUS UND KANN ALS POTENTER ERSATZ FÜR CLT EINGESETZT WERDEN.	15
ABBILDUNG 6: DARGESTELLT IST EIN HEURISTISCHES MODELL DER PORENREGION DES K $_{Ca}$ 3.1-KANALS SOWIE ANGEDEUTET DIE INTERAKTIONSWEISE MIT DEM ANTAGONISTEN TRAM-34. DAS SCHAUBLID DIENT ZUR RÄUMLICHEN VERANSCHAULICHUNG DES PUTATIVEN BLOCKIERUNGSMECHANISMUS DES K $_{Ca}$ 3.1-KANALS DURCH TRAM-34.	16
ABBILDUNG 7: ABGEBILDET IST DER MOLEKULARE AUFBAU DES K $_{Ca}$ 1.1-KANALS IN SCHEMATISCHER DARSTELLUNG MIT FÜR SEINE FUNKTIONSWEISE WICHTIGEN CHARAKTERISTIKA.	19
ABBILDUNG 8: A: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ABLAUFES EINER GELELEKTROPHORESE MIT BESCHREIBUNG DER EINZELNEN SCHRITTE. B: MULTIPLEX-PCR FÜR DIE ROUTINEMÄßIGE K $_{Ca}$ 3.1-GENOTYPISIERUNG. DEN WILDTYP (+/+) ERKENNT MAN AN DER 160 BP BANDE, DIE KNOCK-OUT-MAUS (-/-) AN DER 320 BP BANDE. HETEROZYGOTE MÄUSE (-/+) WEISEN BEIDE BANDEN AUF.	30
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ABLAUFENDEN SCHRITTE IN DER IHC. <i>BILD 1</i> : BINDUNG DES PRIMÄRANTIKÖRPERS AN DAS ANTIGEN. <i>BILD 2</i> : BINDUNG DES BIOTINYLIERTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERS AN DEN PRIMÄRANTIKÖRPER. <i>BILD 3</i> : BINDUNG DES ABC-KOMPLEXES MITTELS AVIDIN AM BIOTINYLIERTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPER. <i>BILD 4</i> : BINDUNG DES CHROMOGENS DAB AN DER BIOTINYLIERTEN PEROXIDASE UND SICHTBARMACHUNG (BRAUNE FÄRBUNG) DURCH ENZYMATISCHE REAKTION.	40
ABBILDUNG 10: FUNKTIONSWEISE DER TAQMAN-SONDE ‚IM REAGENZGLAS‘ MIT ERLÄUTERUNGEN ZU DEN EINZELNEN BILDABSCHNITTEN.	46
ABBILDUNG 11: DIAGRAMM CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN BEI WILDTYPEN (K $_{Ca}$ 3.1 +/+) UND K $_{Ca}$ 3.1-DEFIZIENTEN MÄUSEN (K $_{Ca}$ 3.1 -/-), ANGEGEBEN IN SCORE-WERTEN.	52
ABBILDUNG 12: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN IN NIEREN VON K $_{Ca}$ 3.1-WILDTYPEN. PAS-FÄRBUNG.	52
ABBILDUNG 13: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN IN K $_{Ca}$ 3.1-DEFIZIENTEN MÄUSENIEREN. PAS-FÄRBUNG.	53
ABBILDUNG 14: DIAGRAMM DER IMMUNHISTOCHEMISCH NACHWEISBAREN KOLLAGEN I- UND III-EXPRESSION IN NIEREN VON K $_{Ca}$ 3.1-WILDTYPEN UND K $_{Ca}$ 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN.	54

ABBILDUNG 15: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON KOLLAGEN I UND III IN NIERENGeweBE VON K _{Ca} 3.1-WILDTYPEN.	54
ABBILDUNG 16: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON KOLLAGEN I UND III IN NIERENGeweBE K _{Ca} 3.1-DEFIZIENTER MÄUSE.	55
ABBILDUNG 17: DIAGRAMM DER IMMUNHISTOCHEMISCH NACHWEISBAREN ASMA-EXPRESSION IN NIEREN VON K _{Ca} 3.1-WILDTYPEN UND K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN.	55
ABBILDUNG 18: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON ASMA IN MÄUSENIEREN VON K _{Ca} 3.1-WILDTYPEN.	56
ABBILDUNG 19: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON ASMA IN NIEREN VON K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN.	56
ABBILDUNG 20: DIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS PROXIMALER DIFFERENZIIERTER TUBULI IN NIEREN VON K _{Ca} 3.1-WILDTYPEN UND K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN.	58
ABBILDUNG 21: DIAGRAMM ZUM VERGLEICH DER DURCHSCHNITTlichen NIERENPARENCHYMBREITE IN µM BEI K _{Ca} 3.1-WILDTYPEN UND K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN.	58
ABBILDUNG 22: PHARMAKOKINETIK DER TRAM-34 PLASMA-KONZENTRATION IN NM IN MÄUSEN, UNTERSUCHT ÜBER EINE ZEITSPANNE VON 24 STUNDEN.	60
ABBILDUNG 23: DIAGRAMM CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN IN MÄUSENIEREN, ANGEgeben IN SCORE-WERTEN, IN DER KONTROLLGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT DEM PUREN VEHIKEL ERDNUSSÖL SOWIE IN DER BEHANDLUNGSGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT DEM K _{Ca} 3.1-BLOCKER TRAM-34..	61
ABBILDUNG 24: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN IN MÄUSENIEREN DER KONTROLLGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT DEM REINEN VEHIKEL. PAS-FÄRBUNG.	61
ABBILDUNG 25: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG CHRONISCHER TUBULOINTERSTITIELLER SCHÄDEN IN MÄUSENIEREN DER BEHANDLUNGSGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT TRAM-34. PAS-FÄRBUNG.	62
ABBILDUNG 26: DIAGRAMM DER IMMUNHISTOCHEMISCH NACHWEISBAREN KOLLAGEN I- UND III-EXPRESSION IN MÄUSENIEREN IN DER KONTROLL- SOWIE IN DER BEHANDLUNGSGRUPPE.	63
ABBILDUNG 27: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON KOLLAGEN I UND III IN MÄUSENIEREN DER KONTROLLGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT DEM REINEN VEHIKEL.	63
ABBILDUNG 28: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON KOLLAGEN I UND III IN MÄUSENIEREN DER BEHANDLUNGSGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT TRAM-34.	64
ABBILDUNG 29: DIAGRAMM DER IMMUNHISTOCHEMISCH NACHWEISBAREN ASMA-EXPRESSION IN MÄUSENIEREN DER BEHANDLUNGS- SOWIE DER KONTROLLGRUPPE.	64
ABBILDUNG 30: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON ASMA IN MÄUSENIEREN DER KONTROLLGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT DEM REINEN VEHIKEL.	65
ABBILDUNG 31: HISTOLOGISCHE ABBILDUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBBARKEIT VON ASMA IN MÄUSENIEREN DER BEHANDLUNGSGRUPPE NACH BEHANDLUNG MIT TRAM-34.	65
ABBILDUNG 32: DIAGRAMM ZUM VERGLEICH DER GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER GENE (KALZIUM-ABHÄNGIGE KALIUMKANÄLE SOWIE PROFIBROTISCHE MARKER) IN MÄUSENIEREN UUO-BEHANDELTEN WILDTYPEN UND IN KONTROLLTIEREN OHNE UNILATERALE URETER-OBSTRUKTION.	67

ABBILDUNG 33: DIAGRAMM ZUR VERGLEICHENDEN DARSTELLUNG DER GENEXPRESSION PROFIBROTISCHER MARKER IN UUO-BEHANDELTEN NIEREN VON K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN UND WILDTYPEN.	68
ABBILDUNG 34: AUFTRAGUNG DER GENEXPRESSION PROFIBROTISCHER MARKER IN UUO-BEHANDELTEN NIEREN VON K _{Ca} 3.1-KNOCK-OUT-MÄUSEN IM VERHÄLTNIS ZUR JEWEILIGEN EXPRESSION IN WILDTYPEN (LINKSSEITIG $\Delta\Delta$ -CT-WERT, RECHTSSEITIG PROZENTUALER ANTEIL).....	69
ABBILDUNG 35: QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ABBILDUNG DER TRANSLATION DES K _{Ca} 3.1-PROTEINS IN MÄUSENIEREN NACH UUO-BEHANDLUNG SOWIE IN KONTROLLNIEREN MITTELS WESTERN-BLOT. EINE QUALITATIVE AUSSAGE KANN AM VORHANDENSEIN, EINE QUANTITATIVE AUSSAGE ANHAND DER INTENSITÄT (DICKE) DER BANDEN GETROFFEN WERDEN. ALS ENDOGENER STANDARD WURDE B-ADAPTIN VERWENDET.	70

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ANSATZ DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN ZUR ROUTINEMÄßIGEN GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE.....	28
TABELLE 2: <i>OBEN</i> : VERWENDETE PRIMER FÜR DIE ROUTINEMÄßIGE GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE. <i>UNTEN</i> : PCR-MASTERMIX ZUR ROUTINEMÄßIGEN GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE.....	29
TABELLE 3: <i>OBEN</i> : STOCKLÖSUNG DER NARKOSE MIT GLEICHZEITIGER SCHMERZMEDIKATION. <i>UNTEN</i> : VERABREICHUNGSSCHEMA DER NARKOSE FÜR DIE INTRAPERITONEALE (I.P.) APPLIKATION.	31
TABELLE 4: MENGENVERHÄLTNISSE ZUR HERSTELLUNG DER TRAM-34/ ERDNUSSÖL-LÖSUNG SOWIE DAS VERABREICHUNGSSCHEMA MIT 120 MG/KG KG JE NACH GEWICHTSKATEGORIE DER MAUS.....	32
TABELLE 5: ANSATZ DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN FÜR DIE TRICHRON-FÄRBUNG (MASSON-GOLDNER-FÄRBUNG).....	34
TABELLE 6: ANSATZ DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN FÜR DIE PAS-FÄRBUNG (<i>PERIODIC ACID-SCHIFF STAIN</i>).....	35
TABELLE 7: ANSATZ DER NÖTIGEN GEBRAUCHSLÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE.	37
TABELLE 8: SCHEMA DER ABSTEIGENDEN ALKOHOLREIHE FÜR DIE DEPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG DER GEWEBESCHNITTE INKLUSIVE DES PEROXIDASEBLOCKS.	38
TABELLE 9: SCHEMA DER AUFSTEIGENDEN ALKOHOLREIHE ZUR DEHYDRIERUNG DER GEWEBESCHNITTE NACH ABSCHLUSS DER IMMUNHISTOCHEMIE.	41
TABELLE 10: NAMEN UND SEQUENZEN DER FÜR DIE TAQMAN™-REAL TIME-RT-PCR VERWENDETEN PRIMER.....	44

1 EINLEITUNG

1.1 Physiologische Bedeutung der Niere

Die Niere spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen. Dazu zählen die Regulation der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie des Säure-Basen-Haushalts, die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und körperfremden Substanzen (Entgiftungsfunktion) sowie die Synthese und Sekretion verschiedener Hormone und Faktoren, welche unter anderem der Blutdruckregulation dienen. Darüber hinaus fungiert sie als Zielorgan extrarenal gebildeter Hormone (Classen et al., 2004; Silbernagel & Despopoulos, 2001). Versagen die zahlreichen Funktionen, so hat dies massive Auswirkungen auf Gesundheit, Morbidität und Mortalität.

1.2 Terminales Nierenversagen – Epidemiologische Daten

In Deutschland mussten laut Jahresbericht der QuaSi Niere 2005/2006 Ende 2005 insgesamt 63.427 Patienten mit einem Nierenersatzverfahren versorgt werden. Verglichen mit den epidemiologischen Daten aus den Jahren zuvor lässt sich seit 1997 im Schnitt ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz mit 4,8% und der Inzidenz mit 5,2% an Patienten mit ESRD (End Stage Renal Disease) und Nierenersatztherapie verzeichnen. Dieser gesteigerte Zuwachs lässt sich jedoch nicht alleine auf den demographischen Wandel zurückführen, sondern erfordert einen Blick auf die Diagnoseverteilung bei Nierenersatztherapie. Hierbei stellt die diabetische Nephropathie auf der Basis eines Diabetes mellitus (Typ II > Typ I) - mit einer Prävalenz von 28% und einer Inzidenz von 35% - den größten Anteil dar, gefolgt von vaskulären Nephropathien, Glomerulonephritiden, interstitiellen Nephritiden u.a. (Frei & Schober-Halstenberg, 2005/2006). Es handelt sich hierbei zumeist um chronische Nierenerkrankungen, die über kurz oder lang zu einer fortschreitenden und unwiderruflichen Reduktion der

Nierenfunktion führen und somit häufig in ein terminales Nierenversagen münden, welches die Notwendigkeit einer lebenslangen Nierenersatztherapie nach sich zieht. Terminales Nierenversagen und Nierenersatztherapie stellen dabei ungeachtet ihrer Ursache einen Risikofaktor für Folgeerkrankungen insbesondere kardiovaskulärer Genese dar und gehen mit erhöhter Mortalität einher. Zu den Haupttodesursachen zählen dabei in allen Altersgruppen kardiovaskuläre Ereignisse (53,1%), gefolgt von Infektionen (12,1%) und Malignomen (8,8%) (QuaSi Niere 2005/2006). Neben der verkürzten Lebenserwartung steigt der Leidensdruck der Patienten bedingt durch lebensnotwendige Dialyseverfahren oder durch eine zwingende Immunsuppression nach Nierentransplantation in erheblichem Maße. Die kumulativen Kosten der Nierenersatztherapie belaufen sich schätzungsweise auf gut 3 Mrd € pro Jahr, was erhebliche sozioökonomische Auswirkungen nach sich zieht (Hörl & Wanner, 2003). Das terminale Nierenversagen stellt folglich mit steigender Bedeutung ein klinisches und volkswirtschaftliches Problem dar.

1.3 Nierenfibrose

Erkrankungen der Niere - ausgehend von leichter Funktionseinschränkung bis hin zum kompletten Ausfall der Nierenfunktion - gehen allesamt einher mit mehr oder weniger deutlichen Auswirkungen auf ihre multifunktionellen Aufgaben (Classen et al., 2004). Die gemeinsame Endstrecke der Nierenerkrankungen ist das chronisch progressive Nierenversagen mit der Nierenfibrose als pathologisches Korrelat (Strutz & Neilson, 2003).

1.3.1 Allgemeiner Pathomechanismus der Nierenfibrose

Die zugrunde liegenden Erkrankungen, die zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen können, sind mannigfaltig. Unabhängig von der auslösenden Ursache geht dem Funktionsverlust als gemeinsame Endstrecke ein fortschreitender und irreversibler Vernarbungsprozess voraus. Die Pathogenese der Nierenfibrose lässt sich in vier willkürliche Phasen einteilen (Eddy et al., 2000): Zu Beginn steht die *Phase der*

Tubuluszellaktivierung und Schädigung peritubulärer Kapillaren, was das Einwandern mononukleärer Zellen und die interstitielle Besiedelung durch aktivierte Fibroblasten oder Myofibroblasten begünstigt. Auch persistierende glomeruläre Schäden werden als ursächlich beschrieben mit der Folge lokaler Hypertension, Anstieg der Einzelnephron-GFR und schwerer glomerulärer Proteinurie. Es folgt die *entzündungsbedingte Signalphase zur Fibrogenese* mit der Freilassung fibrosefördernder Wachstumsfaktoren und Cytokine, darunter TGF β , CTGF, Angiotensin II, EGF, ET-1, PDGF, bFGF, TNF α und IL-1. In der *dritten Phase* steht die *Fibrosierung* im Vordergrund mit der Akkumulation extrazellulärer Matrix (ECM; bestehend aus fibrillärem Kollagen, Fibronectin, Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen), bedingt durch gesteigerte ECM-Synthese und gestörten ECM-Abbau. Ein Hauptmerkmal der Nierenfibrose ist, dass sich auch in dieser postentzündlichen Phase die Proliferation matrixproduzierender Zellen sowie ihre Matrix-Synthese nicht selbst limitiert, sondern vielmehr autonom weiterläuft, wobei eine Aufrechterhaltung durch auto- bzw. parakrine Stimulation, direkte Zell-Zell-Kontakte, Integrine der ECM oder Umgebungsbedingungen wie Hyperglycämie und Hypoxie diskutiert werden (Strutz & Neilson, 2003). Es entsteht ein Ungleichgewicht mit einerseits gesteigerter Matrix-Synthese und andererseits gestörtem Matrix-Abbau (Eddy 2000). Als *letzte Folge* des fortgeschrittenen Vernarbungsprozesses kommt es zur irreversiblen *Zerstörung der Nierenarchitektur und -funktion* (Eddy, 2000; Harris & Neilson, 2006; Strutz & Neilson, 2003; Zeisberg et al., 2000). Die Anzahl intakter Nephrone sowie die GFR nehmen kontinuierlich ab, wobei insbesondere die morphologischen Veränderungen des Tubulointerstitiums die Funktionsabnahme der Niere gut reflektieren: Zwischen Ausmaß der tubulointerstitiellen Beteiligung und Restfunktion der Niere besteht eine inverse Korrelation. Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigung erlangt somit einen bedeutenden prognostischen Wert (Strutz & Müller, 2006; Strutz & Zeisberg, 2006). Der Fibrosierungsprozess ist zweifelsohne hochkomplex und wird von zahlreichen Faktoren mitbeeinflusst. So wird Ausmaß und Reversibilität des Schadens mitunter teilweise bestimmt durch die Balance oder Imbalance zwischen renalen Proteinasen (MMP-2, MMP-

9, uPA, lysosomale Cathepsine), endogenen Proteinaseinhibitoren (TIMP-1, PAI-1) und molekularem Aufbau der fibrotischen Matrix mit Fibronectin, fibrillärem Kollagen, interstitiellen und basalmembranösen Proteinen, Proteoglycanen und Glycoproteinen bis hin zur enzymatischen Quervernetzung (Eddy, 2005).

1.3.2 Herkunft der (Myo)fibroblasten

Ein Hauptcharakteristikum der tubulointerstitiellen Fibrose ist das Auftreten von aktivierten Fibroblasten oder Myofibroblasten im Tubulointerstitium der Niere, welche sich durch eine ausgeprägte Synthese von ECM auszeichnen (Strutz & Zeisberg, 2006). Als klassisches Merkmal dieser Myofibroblasten gilt eine de-novo Expression von glattmuskulärem Aktin (alpha smooth muscle actin, α SMA), wodurch sie morphologisch und funktionell glatten Muskelzellen ähneln (Majno et al., 1971). α SMA verleiht den Zellen kontraktile Eigenschaften und damit die Fähigkeit zum Gewebs-Remodelling bei Wundheilung (Tomasek et al., 2002). Im Interstitium einer gesunden Niere kommen Myofibroblasten normalerweise nicht vor (Ina et al., 2002). Diverse Studien fanden bereits Korrelationsmuster bezüglich Fibroblasten und erkranktem Gewebe, darunter einen zahlenmäßig erhöhten Fibroblastenanteil in fibrosiertem Gewebe verglichen mit gesundem Nierengewebe (Strutz, Renziehausen et al., 2001; Müller & Rodemann, 1991) oder einen durch Myofibroblastenanteil definierten möglichen prädiktiven Aussagewert bezüglich Stadium und Progression des Nierenversagens (Roberts et al., 1997; Qi et al., 2006).

Umstritten bleibt bis heute die Frage nach der Herkunft der Myofibroblasten. Im Wesentlichen werden derzeit fünf verschiedene Möglichkeiten diskutiert: erstens die Aktivierung residenter Fibroblasten, zweitens die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT), drittens die Endotheliale-Mesenchymale Transition (EndMT), viertens die Migration hämatopoetischer oder mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark und fünftens die Rekrutierung aus periadventitiellen Zellen (s. auch Abb. 1) (Strutz & Müller, 2006; Qi et al., 2006). Mittlerweile gibt es Hinweise auf eine Beteiligung aller Quellen, abhängig vom Zeitpunkt der Schädigung (Grande & López-Novoa, 2009).

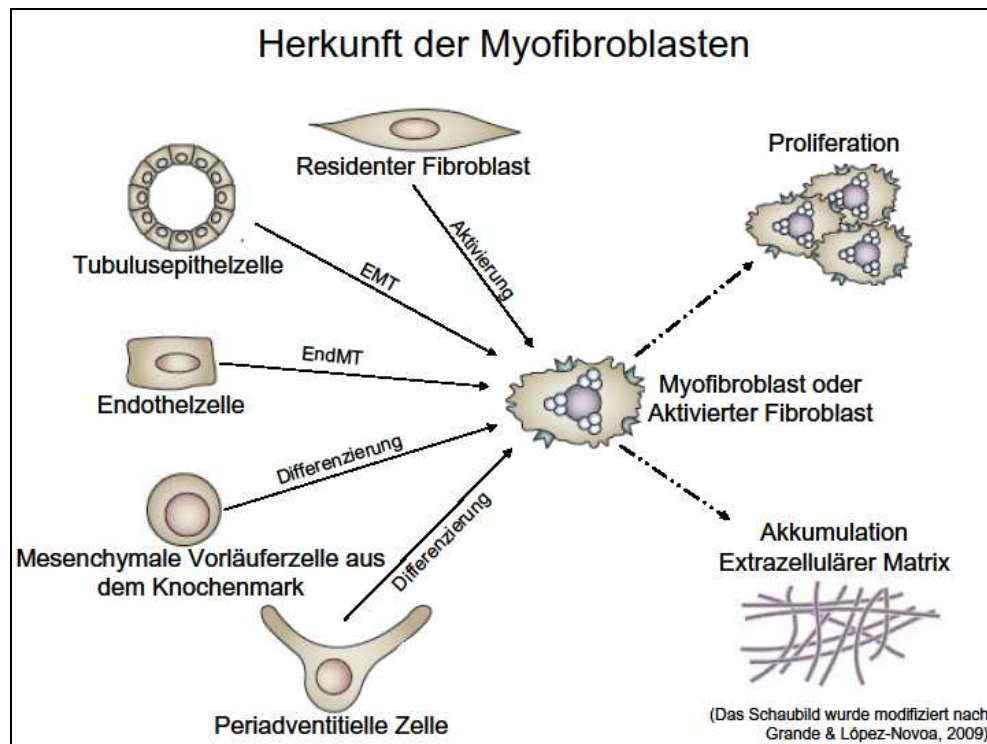


Abbildung 1: Skizze zur umstrittenen Herkunft der Myofibroblasten als matrixproduzierende Zelle. Die Abbildung wurde modifiziert nach Grande & López-Novoa, 2009.

1.3.2.1 Aktivierung residenter Fibroblasten

1867 definierte Cohnheim Fibroblasten als durch Migration in den Entzündungsprozess niedergelassene Leukozyten (Strutz & Müller, 2006). Rund ein Jahrhundert später wurde diese Theorie widerlegt mit der schlagenden Antithese, Fibroblasten im Wundheilungsprozess seien lokalen Ursprungs (Ross et al., 1970). Heute existieren die verschiedenen Ursprungstheorien nebeneinander. Unterstützend für den Ursprung der Myofibroblasten aus residenten peritubulären Fibroblasten sind u.a. Studien über eine Co-Expression von α SMA als neu erworbenes kontraktiles Element und Ekto-5-Nukleotidase (5'NT) als Marker für lokale kortikale peritubuläre Fibroblasten (Le Hir et al., 2005). Insbesondere in der frühen Phase der Nierenschädigung mit konsekutiver Fibrosierung scheinen residente Fibroblasten die Hauptquelle der aktivierten Fibroblasten zu sein (Grande & López-Novoa, 2009).

1.3.2.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition - EMT

Während der Embryonalentwicklung kommt es gehäuft zur Umwandlung und Umdifferenzierung von mesenchymalem in epitheliales Gewebe. Dieser Vorgang wird Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) genannt (Hay et al., 1995). Seit erstmaliger Notation 1982 hat sich eine Theorie weit verbreitet, die besagt, dass neben dem physiologischen Prozess der MET auch das pathologische Pendant, eine Transdifferenzierung vom Epithel zurück zum Mesenchym, die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) mit Verlust epithelialer Marker (u.a. E-Cadherin, Zytokeratin) und Rückergewinnung mesenchymaler Marker (u.a. α SMA, Vimentin, FSP-1) existiert (Greenburg & Hay, 1982; Hay et al., 1995; Strutz et al., 1995; Iwano et al., 2002). Heute wird der EMT große Bedeutung bei der Metastasierung von Tumoren beigemessen, sodass sie insbesondere in der Onkologie von großer Bedeutung ist (Grande & López-Novoa, 2009). Begünstigt durch diverse Faktoren wie beispielsweise TGF β 1 kommt es mittels verschiedener Signaltransduktionswege zum Verlust epithelialer Zelladhäsion, zu de novo Expression von α SMA und Reorganisation des Aktgerüsts, Zerstörung der tubulären Basalmembran und dadurch zu verstärkter Zellmigration, Invasion und EMT (Liu et al., 2004; Yang, Shultz et al., 2002). In Studien von Iwano et al. wurde der Anteil der aus EMT rekrutierten Fibroblasten auf nahezu ein Drittel geschätzt (Iwano et al., 2002).

1.3.2.3 Endotheliale-Mesenchymale Transition (EndMT)

Ähnlich wie bei der EMT scheinen bei der EndMT Transdifferenzierungsprozesse eine wichtige Rolle zu spielen, stimuliert durch u.a. TGF β 1, die revers zur embryonalen Entwicklung (Mesenchym zu Endothel) nun vom Endothel zurück zum Mesenchym laufen (Goumans et al., 2008). So scheint die EndMT eine Rolle bei der portalen Hypertonie und der kardialen Fibrose zu spielen (Goumans et al., 2008; Kitao et al., 2009). Neuere Studien zeigen EndMT auch als einen Weg der Rekrutierung aktivierter Fibroblasten und Myofibroblasten im Rahmen der Nierenfibrose (Zeisberg et al., 2008).

1.3.2.4 Mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark

Nach einer weiteren Theorie soll sowohl der normale Zellturnover des renalen Epithels als auch die Regeneration geschädigten Nierengewebes durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark stattfinden (Poulsom et al., 2001), basierend auf dem Konzept einer gemeinsamen Progenitorzelle von epithelialer und mesenchymaler Zelllinie (Lang & Fekete, 2001). Für diese Theorie sprechen Beobachtungen an intestinalen Myofibroblasten, die durch PDGF und den Stammzellfaktor SCF aktiviert und zur Proliferation angeregt werden (Powell et al., 1999), sowie der Nachweis migrierender mesenchymaler Vorläuferzellen im Entzündungsgebiet chronisch abgestoßener Spendernieren (Grimm et al., 2001). Der Anteil der aus dem Knochenmark entstammenden Fibroblasten wird in gesunden Mäusenieren auf ca. 12% geschätzt (Strutz & Müller, 2006). Insgesamt wird der Beitrag solcher Zellen an der ECM Synthese in erkranktem Nierengewebe weiterhin kontrovers diskutiert (Roufosse et al., 2006).

1.3.2.5 Periadventitielle Zellen (Perizyten, Perivaskuläre Fibroblasten)

Die Ausbreitung einer Entzündung startet in der Regel von Gefäßen aus und benötigt einige Zeit zur Verbreitung auf das gesamte Gewebe. Einige Arbeitsgruppen beschreiben in ihren Arbeiten eine hauptsächlich fokale, periadventitiell gelegene Fibrosierung (Wiggins et al., 1993; Faulkner et al., 2005). Unterstützt wird diese Theorie durch Nachweis vaskulärer Marker in den Myofibroblasten (Humphreys et al., 2010). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass durch Gefäßschädigung oder durch vaskuläre Faktoren Perizyten zu Migration und Differenzierung in Myofibroblasten stimuliert werden (Lin et al., 2008).

1.3.3 Molekulare Mechanismen der Fibrose

Myofibroblasten stellen eine aktivierte Fibroblastenform dar, die hauptsächlich für die ECM Produktion bei der Nierenfibrose verantwortlich ist (Qi et al., 2006). Sie zeichnen sich durch eine spindelartige Form und Ausläufer aus und haben Ähnlichkeit mit glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) (Ina et al., 2002), charakterisiert durch die Expression von α SMA und gebündelten Mikrofilamenten (Sappino et al., 1990; Qi et al., 2006), welche ihre kontraktile Eigenschaften erklären (Tomasek et al., 2002),

durch ein gut ausgebildetes raues ER zur sekretorischen Funktion sowie durch ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte (Qi et al., 2006). Die Fibroblasten selbst stellen eine durch topografische Differenzierung stark heterogene Gruppe dar. Sie erfüllen mehr oder weniger zellautonom durch auto- und parakrine Sekretion Aufgaben wie ECM-Sekretion als Teilnahme bei entzündlichen Prozessen, Induktion bestimmter Gene, Signalgebung für Migration sowie Permission entarteter Zellen (Chang et al., 2002).

Die Aktivierung und Proliferation residenter Fibroblasten kann durch diverse Stimuli erfolgen (Strutz & Zeisberg, 2006). Im Folgenden soll nur ein Ausschnitt bereits erlangter Erkenntnisse vorgestellt werden.

TGF β 1 und seine intrazellulären Kaskaden

Taktgeber fibrotischer Prozesse sind Zytokine - allen voran TGF β 1, das über mehrere intrazelluläre Signaltransduktionswege Zellen (in diesem Fall epithelialen Ursprungs) beeinflussen kann. Via RhoA/ROCK (RhoA ist das G-Protein *Ras homologes Gen, Typ A*, ROCK ist die *RhoA*-Kinase) werden Expression, Formation und Reorganisation des Zytoskeletts modifiziert, was im Endeffekt zu einer verstärkten Zellmigration und Invasion führt, während mittels p38/MAPK vornehmlich die Apoptose der Zelle begünstigt wird. Über Smad2, 3 und 4 Proteine werden TGF β 1-regulierte Gene transkribiert, die ebenfalls Zellinfiltration, EMT und Apoptose fördern (Liu et al., 2004; Bascands & Schanstra, 2005). Hemmende Einflüsse auf TGF β 1 konnten durch BMP-7, ein Mitglied der TGF β 1-Superfamilie (Sugimoto et al., 2007; Zeisberg et al., 2003; Li et al., 2004; Zeisberg, Shah et al., 2005; Klahr & Morrissey, 2003) und HGF (Yang & Liu, 2002; Klahr & Morrissey, 2003; Liu et al., 2004) gezeigt werden.

bFGF-2 und der Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg

Ein entscheidender Zwischenmediator des TGF β 1 ist der Wachstumsfaktor bFGF-2 (Strutz et al., 2002). Durch TGF β 1 induziert (Strutz, Zeisberg et al., 2001), führt er mittels endo-/ auto- und parakriner Stimulation zu Wachstum und Proliferation der Fibroblasten und treibt so die Fibrose maßgeblich voran (Strutz & Neilson, 2003). Interessanterweise konnte in Fibroblasten myogenen Ursprungs gezeigt werden, dass es infolge einer bFGF

Stimulation via Ras/Raf/MEK/ERK-Induktion (Peña et al., 2000; Pat et al., 2005) auch zu einer Hochregulation bestimmter Ionenkanäle wie beispielsweise des intermediären kalziumaktivierten Kaliumkanals $K_{Ca3.1}$ kommt (Shepherd et al., 2007; Peña et al., 2000).

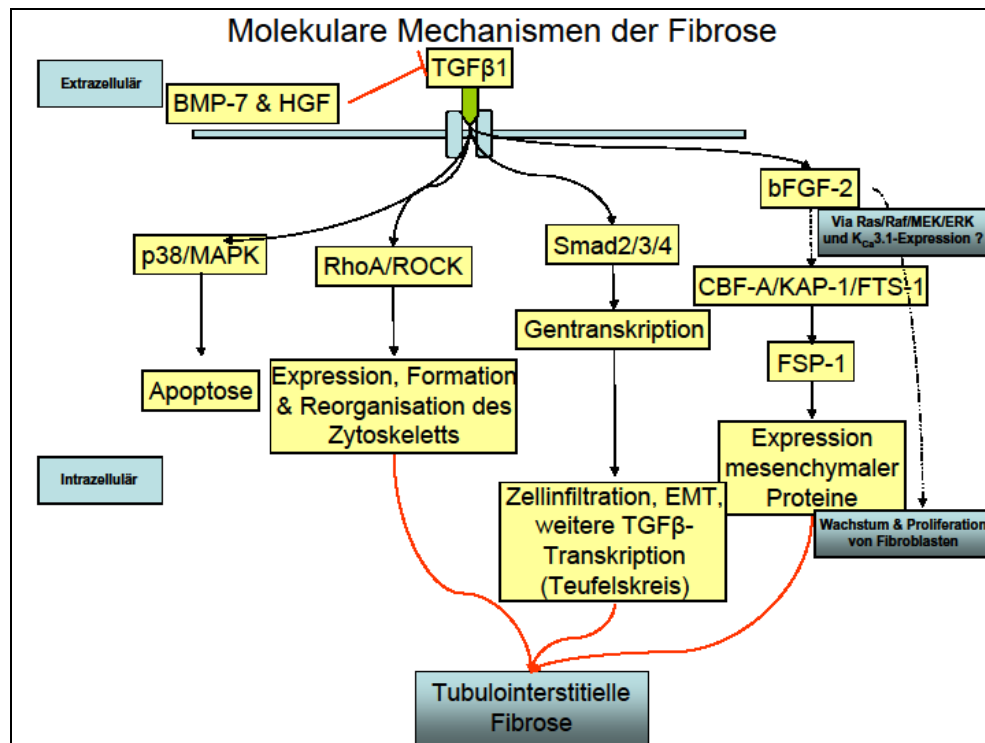


Abbildung 2: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen der Fibrose. Abgebildet ist eine Übersicht einiger intrazellulärer Auswirkungen des TGFβ1.

1.4 Kaliumkanäle in der Niere

In der Niere existiert eine Vielzahl von Kaliumkanälen, die Gegenstand aktiver Forschung sind und deren Aufgaben teilweise stark divergieren. Vier Hauptklassen werden repräsentiert durch erstens Calcium-aktivierte K^+ -Kanäle (K_{Ca}), zweitens spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_v), drittens einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle (K_{ir}) und viertens K^+ -Kanäle mit zwei Poren (2P channels), die in unterschiedlich dichter Verteilung sowohl in epithelialem als auch in mesangialem und vaskulärem Gewebe der Niere zu detektieren sind (Hebert et al., 2005). Da in der vorliegenden Arbeit Calcium-aktivierte Kaliumkanäle im Mittelpunkt stehen, wird nun auf diese genauer eingegangen.

1.5 Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle

Die Genfamilie der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle umfasst 8 Mitglieder. Diese werden aufgrund des phylogenetischen Verwandtschaftsgrades und biophysikalischer Eigenschaften nochmals unterteilt in zwei Subfamilien: die Subfamilie der spannungsabhängigen und die der spannungsunabhängigen Kanäle. (Blatz & Magleby, 1987; Hebert et al, 2005; Wulff et al, 2007).

Zu der 4 Mitglieder umfassenden Subfamilie der spannungsabhängigen Kanäle zählt der $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ (neue Nomenklatur, Gutman et al., 2003, bekannt auch als BK oder Maxi- K_{Ca}) mit hoher Leitfähigkeit (150-250 pS).

Zu der ebenfalls 4 Mitglieder umfassenden Subfamilie der spannungsunabhängigen Kanäle zählen der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (bekannt auch als IK) mit intermediärer Leitfähigkeit (20-40 pS) und drei weitere Subtypen mit kleiner Leitfähigkeit (5-10 pS), $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ (bekannt auch als SK1, SK2, und SK3).

Wie der Name schon suggeriert, werden K_{Ca} -Kanäle durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an einer zytosolisch gelegenen Bindungsstelle aktiviert. In Zellen erfolgt diese Aktivierung durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann zum einen durch eine Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (endoplasmatisches Retikulum, ER, und sarkoplasmatisches Retikulum, SR) und/oder durch einen Kalziumeinstrom über kalziumpermeable Kationenkanäle aus dem Extrazellulärraum erfolgen (Wulff et al, 2007; Borisova et al., 2007). Die Aktivierung der Kanäle erzeugt durch ihre erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit einen Ausstrom positiv-geladener Kaliumionen und damit eine Negativierung des Membranpotentials (Hyperpolarisation) in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotentials von -89 mV.

Diese das Membranpotential modulierenden Eigenschaften Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle sind u.a. für die Re- bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran nach einem Aktionspotential in elektrisch erregbaren Zellen, aber auch für Membranpotential abhängige Sekretionsprozesse (z.B. von Chlorid) in nicht-erregbaren Zellen wichtig. Darüber hinaus moduliert eine Hyperpolarisation reflektorisch-positiv den Ca^{2+} -Einstrom aus dem

Extrazellulärraum, da die Hyperpolarisation die elektrische Triebkraft für den Einstrom positiver Ca^{2+} -Ionen erhöht. Folglich tragen Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle auch zu einer anhaltend erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei. Letztere ist insbesondere wichtig für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängige Genregulations- und Zellproliferationsprozesse, wie z.B. bei der T-Lymphozyten-Aktivierung und -Expansion (Fanger et al., 2001).

1.5.1 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (IKCa-Kanäle)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit dem $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, dem K_{Ca} -Subtyp intermediärer Leitfähigkeit. Im Folgenden wird daher nun ausführlicher auf dessen Eigenschaften eingegangen.

1.5.1.1 Molekularer Aufbau des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals

Der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal setzt sich aus einem Homotetramer zusammen, dessen vier Untereinheiten wiederum jeweils sechs transmembranspannende Segmente (S1-S6) aufweisen, wobei sowohl der C- als auch der N-terminale Bereich intrazellulär lokalisiert sind (Ishii et al., 1997). Die Kanalpore wird von einer in die Membran hineinzeigenden Schleife, dem sog. 'pore loop', zwischen den Segmenten S5 und S6 gebildet.

Je Untereinheit befindet sich im proxymalen Bereich des carboxyterminalen Endes eine Calmodulin (CaM)-Bindungsstelle, an welche CaM konstitutiv gebunden ist. CaM fungiert hier als eigentlicher Ca^{2+} -Sensor des Kanals. Die Bindung von Ca^{2+} an CaM induziert eine Konformationsänderung des Moleküls, die wiederum eine Konformationsänderung des Kanals induziert und so zu einer Kanalaktivierung führt (Khanna et al., 1999; Fanger et al., 1999). Die CaM-medierte Kalziumsensitivität ist hierbei mit einer EC_{50} von $0,3 \mu\text{mol/l}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ hoch (Ishii et al., 1997; Latorre et al., 1989; Nilius & Droogmans, 2001). Da, wie oben bereits erwähnt, die Kanalaktivität zusätzlich spannungsunabhängig ist, kann der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ auf geringe Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration eine ausgeprägte Hyperpolarisation erzeugen und damit wichtige zelluläre Funktionen in Gang setzen, auf die im Weiteren näher eingegangen wird.

1.5.1.2 Gewebeexpression und Eigenschaften des $K_{Ca3.1}$ -Kanals

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal ist in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, so z.B. in Erythrocyten, Lymphocyten, Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen, vaskulären Endothelzellen und in intestinalen und respiratorischen Epithelzellen (Wulff et al., 2007; Fanger et al., 2001; Thompson-Vest et al., 2006; Jensen et al., 1998). Zu seinen physiologischen Funktionen in diesen Zellen und Geweben gehören u.a. die Regulation des Zellvolumens, der Zellmigration, endothelialer Vasodilatationsprozesse, sowie die Modulation der Wasser- und Chloridsekretion (Peña & Rane, 1999; Thompson-Vest et al., 2006; Hoyer et al., 1996; Köhler et al., 2001; Maier et al., 2005; Köhler et al., 2005; Devor et al., 1996; Devor et al., 1999; Rufo et al., 1996; Lu & Wang, 2000).

Darüber hinaus scheinen $K_{Ca3.1}$ -Kanäle auch bei Zellproliferationsprozessen von großer Bedeutung zu sein. So ist in verschiedenen proliferierenden Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen (Grgic et al., 2005; Köhler et al., 2000), neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen (Köhler et al., 2003; Cheong et al., 2005; Si et al., 2006; Tharp et al., 2008; Wiecha et al., 1998; Kohn et al., 1995), aktivierten T-Zellen (Fanger et al., 2001; Jensen et al., 1999), Epithelzellen (Thompson-Vest et al., 2006), verschiedenen Krebszelllinien (Jager et al., 2004; Ouadid-Ahidouch et al., 2004) und auch in proliferierenden Fibroblasten myogenen Ursprungs (Peña & Rane 1999; Peña et al., 2000) die Expression der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle hochreguliert (für eine Übersicht: Wulff et al., 2007). Diese Hochregulation beruht auf einer erhöhten mRNA-Expression, welche gekoppelt ist an eine Stimulation des Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweges (Peña et al., 2000; Wulff et al., 2007). Durch pharmakologische Blockade der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle kann die Zellproliferation der o.g. Zellen supprimiert werden. Demnach könnte der Kanal auch bei Krankheitsprozessen, die durch eine erhöhte Proliferationsaktivität gekennzeichnet sind, von funktioneller Bedeutung sein. Diese Hypothese wird u.a. durch Untersuchungen belegt, in denen durch Intervention mittels Kanal-Inhibitoren (TRAM-34, Clotrimazol) eine übermäßige Neointimabildung und Entwicklung einer Atherosklerose nach Gefäßschädigung deutlich reduziert werden konnte (Köhler et al., 2003; Toyama et al., 2008). Andere Experimente belegen eine Reduktion der postangioplastischen Restenoserate nach Ballonkatheter-

Intervention, die mittels pharmakologischer Kanalblockade erreicht werden konnte (Köhler et al., 2003; Tharp et al., 2008).

In Untersuchungen zur zellvermittelten Abstoßungsreaktion nach allogener Nierentransplantation ließen sich ebenfalls Erfolge verzeichnen. Durch TRAM-34-vermittelte Kanalblockade konnte die Infiltration mononukleärer Zellen im Gewebe reduziert werden (Grgic et al., 2009).

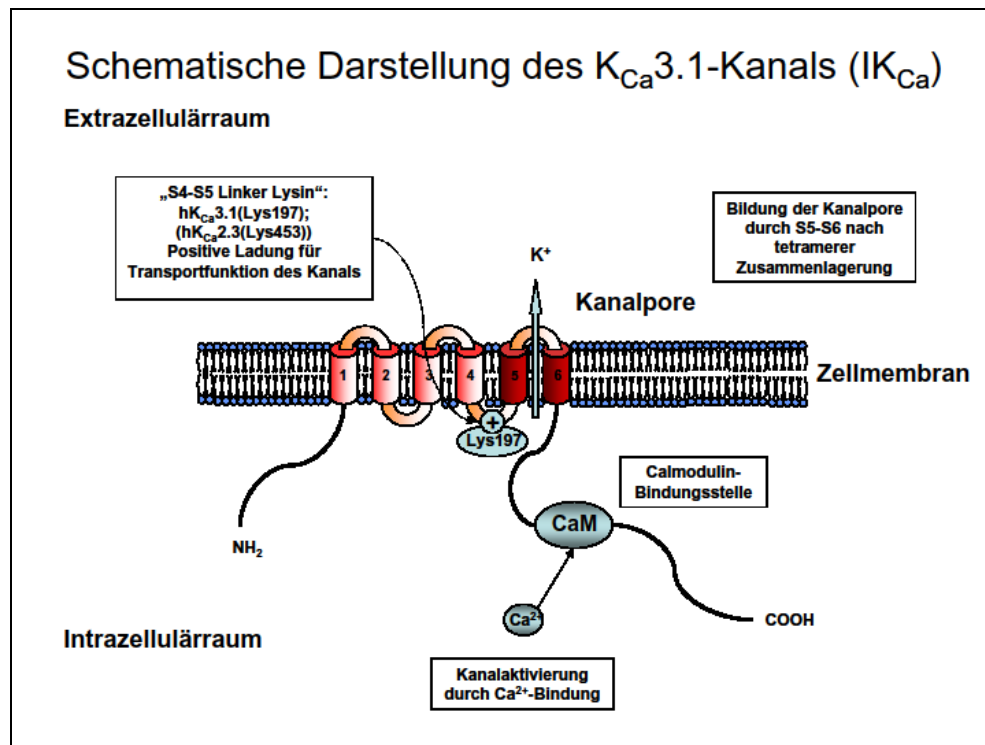


Abbildung 3: Molekularer Aufbau des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in schematischer Darstellung. Abgebildet sind die für seine Funktionsweise und Charakterisierung wichtigen Elemente. Auf ganz ähnliche Weise ist auch der Aufbau des verwandten $K_{Ca}2.x$ -Kanals.

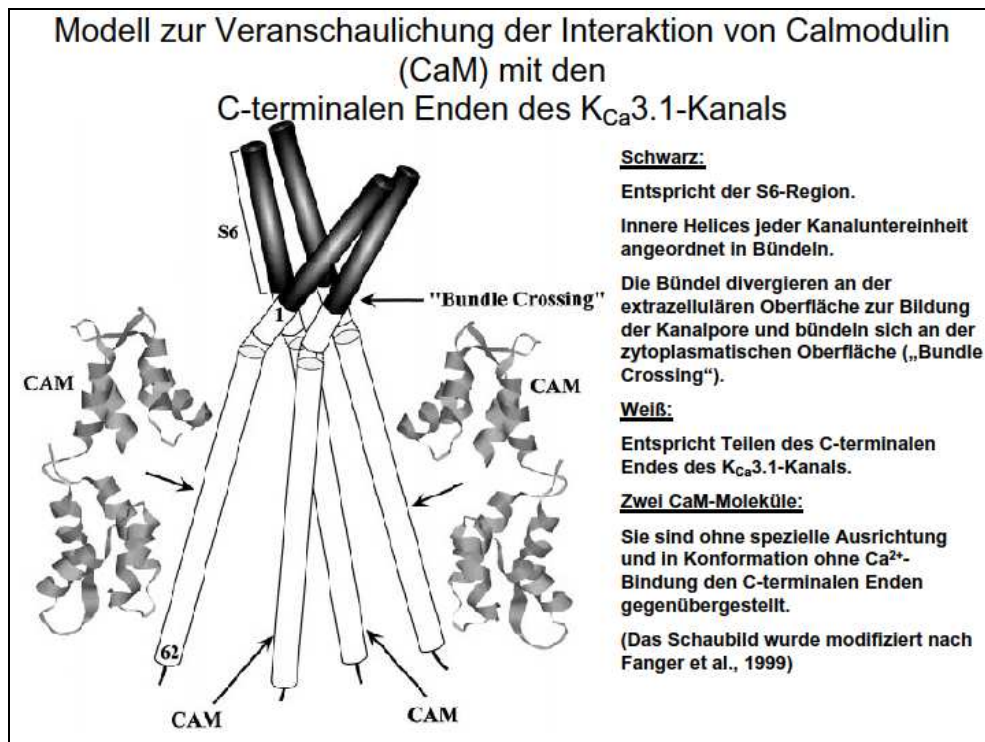


Abbildung 4: Interaktionsmodell zur Veranschaulichung der Funktionsweise von Calmodulin mit den C-terminalen Enden des $K_{Ca}3.1$ -Kanals.

1.5.1.3 Pharmakologie des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Der $K_{Ca}3.1$ -Kanal lässt sich pharmakologisch durch spezifische Agonisten und Antagonisten charakterisieren. Als selektiver $K_{Ca}3.1$ -Öffner gilt 1-Ethyl-2-benzimidazolinon (1-EBIO) (Devor et al., 1996; Jensen et al., 1998). Sein Derivat DCEBIO (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3dihydro-2H-benzimidazol-2-one) stellt einen weiteren potenten Kanalöffner dar (Hansen et al., 2001). Eine Hemmung des Kanals lässt sich durch eine Reihe von Substanzen mit unterschiedlichem Selektivitäts- und Effektivitätsgrad erreichen. Hierunter zählen bspw. Charybdotoxin aus dem Gift des israelischen Skorpions ‚Leirus quinquestriatis‘ (Miller et al., 1985), das Malariamittel Quinin und TBA; aber auch der Calciumantagonist Nitrendipin zeigt hemmende Wirkung (Jensen et al., 1998; Jensen et al., 1999; Rauer et al., 2000). Interessanterweise wirkt der Aktivator des $K_{Ca}1.1$ -Kanals, NS1619, hier als potenter Blocker (Nilius & Droogmans, 2001). Als gleichzeitig potente und selektive Antagonisten gelten die Triarylmethane (TRAM), darunter das Antimykotikum Clotrimazol (CLT, 1-[(2-Chlorphenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazol), welches jedoch gleichzeitig Cytochrom P450 hemmt und somit andere Zellfunktionen beeinträchtigen

kann (Wulff et al., 2000; Wulff et al., 2001; Jensen et al., 1998; Jensen et al., 1999). Dem CLT überlegen ist das CLT-Derivat TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol), welches sich durch seine 200 bis 1500fache Selektivität für $K_{Ca3.1}$ gegenüber anderen Kaliumkanälen sowie durch Unabhängigkeit von Enzymen des Cytochrom P450-Systems als selektivster und geeignetster Kanalblocker auszeichnet (Wulff et al., 2000). TRAM-34 scheint aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran zu durchdringen und durch hydrophobe Wechselwirkung mit zwei Aminosäuren in der S5-P-S6 Region (Thr250 und Val275) den Ionenkanal mit seiner propellerartigen Form zu verschließen (Wulff et al., 2001).

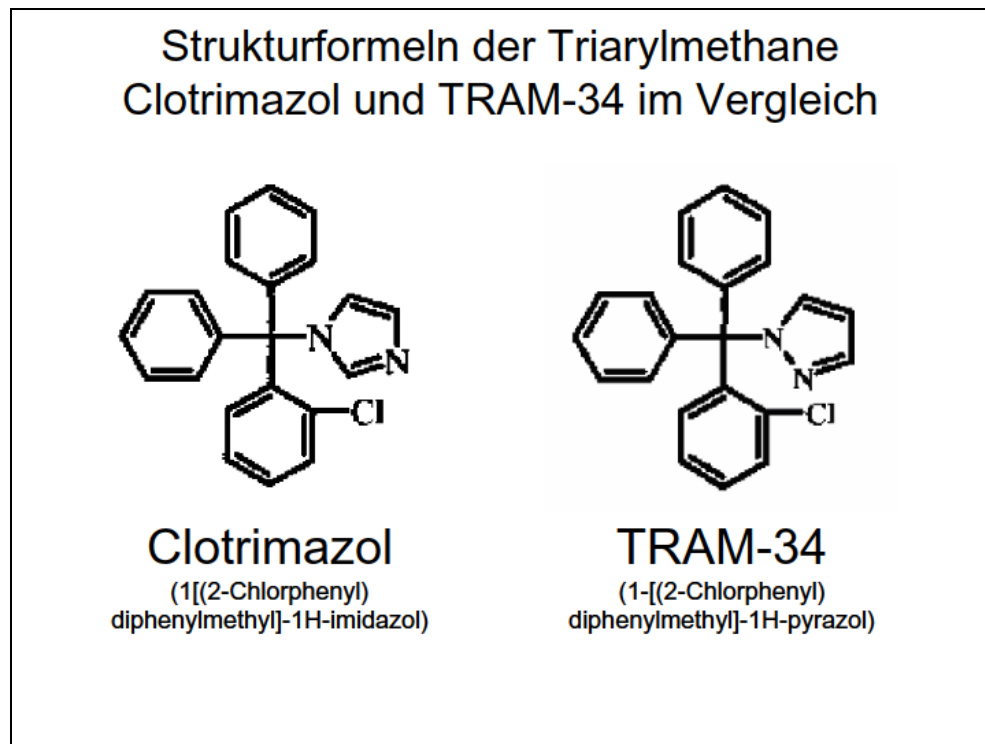


Abbildung 5: Abgebildet sind die Strukturformeln von zwei $K_{Ca3.1}$ -Blockern der Triarylmethan-Klasse. Das Antimykotikum Clotrimazol (CLT) interagiert gleichzeitig mit dem Cytochrom-P450-System, das verwandte Molekül TRAM-34 zeichnet sich durch Unabhängigkeit von CyP450 sowie hohe Selektivität und Effizienz aus und kann als potenter Ersatz für CLT eingesetzt werden.

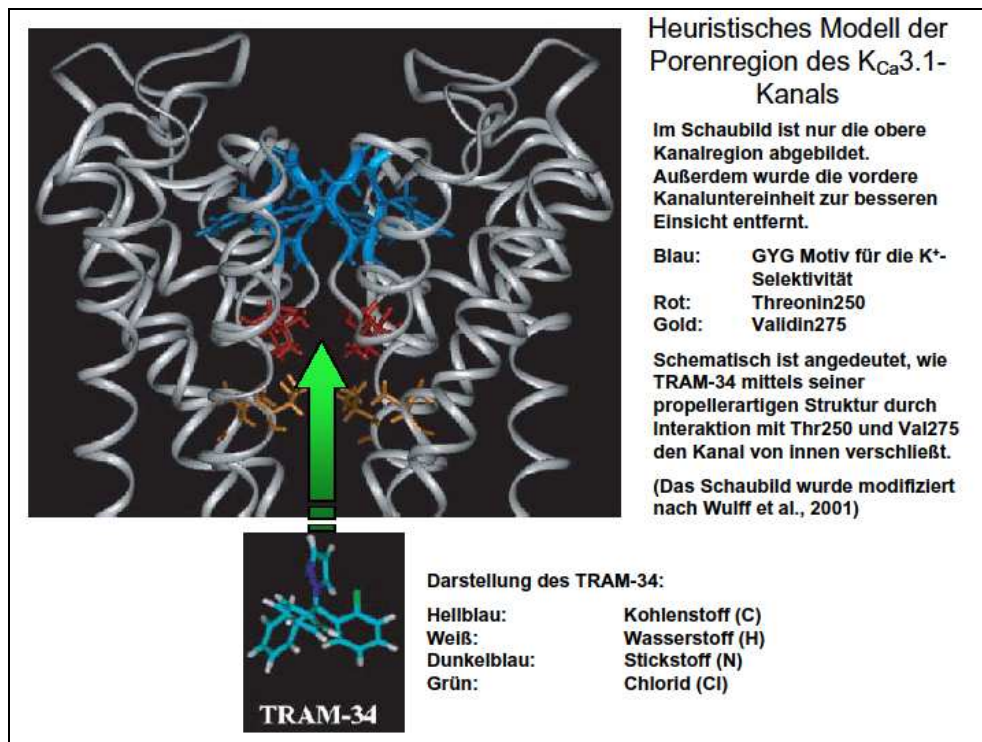


Abbildung 6: Dargestellt ist ein heuristisches Modell der Porenregion des $K_{Ca3.1}$ -Kanals sowie angedeutet die Interaktionsweise mit dem Antagonisten TRAM-34. Das Schaubild dient zur räumlichen Veranschaulichung des putativen Blockierungsmechanismus des $K_{Ca3.1}$ -Kanals durch TRAM-34.

1.5.1.4 Bedeutung des $K_{Ca3.1}$ bei Proliferation und Migration von Zellen

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass der $K_{Ca3.1}$ -Kanal eine mitosefördernde Funktion innehat. Eine zunehmend hervorgehobene Bedeutung zeigt sich darüber hinaus jedoch in Zusammenhang mit der Proliferation von Zellen. So konnte in Endothelzellen eine Hochregulation der $K_{Ca3.1}$ -Expression durch mitogene Stimulation mit bFGF und VEGF beobachtet werden, die einherging mit gesteigerter Endothelzell-Proliferation und Angiogenese (Köhler et al., 2003; Grgic et al., 2005; Cheong et al., 2005). Ebenso ist seine Hochregulierung wichtig für die Proliferation stimulierter T-Lymphocyten (Ghanshani et al., 2000; Fanger et al., 2001).

Zellproliferation und -migration sind elementar bei Wundheilungs- und Immunabwehrprozessen, aber auch bei der Formation und Ausbreitung tumorösen Gewebes. Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal konnte mittlerweile als Teil der zellulären „Migrations-Maschinerie“ bspw. in MDCK-FC (Tubulusepithelzellen) identifiziert werden (Schwab et al., 1994 & 2006). In

Fibroblasten zeigt der $K_{Ca3.1}$ in postischämischem und allgemein entzündlichem Gewebe sowie in Tumorgewebe eine erhöhte Expression, die ebenfalls auf seine wachstums- und migrationsregulierende Rolle zurückgeführt wird (Saito et al., 2002; Rane, 2000; Peña & Rane 1999). Ähnliche Funktionen werden $K_{Ca3.1}$ -Kanälen auch in microglialen Zellen zugeschrieben, welche auf ZNS-Ebene Regenerationsfunktionen ähnlich der Fibroblasten erfüllen (Schilling et al., 2004).

1.5.2 $K_{Ca1.1}$ (BKCa-Kanäle)

Aufbau

$K_{Ca1.1}$ -Kanäle sind nicht-rektifizierende K^+ -Kanäle mit hoher Einzelleitfähigkeit von 150-250 pS (Hebert et al., 2005). Im Unterschied zu ihren verwandten Kanälen $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.x}$ weisen sie neben einer Ca^{2+} -Sensitivität (Papassotiriou et al., 2000; Hoyer et al., 1994) zusätzlich eine Spannungsabhängigkeit durch gesteigerte Aktivität bei Depolarisation der Zellmembran auf (Kamouchi et al., 1999; Daut et al., 1994).

$K_{Ca1.1}$ -Kanäle sind aus zwei ungleichen Untereinheiten aufgebaut, einer für den Ionentransport porenbildenden α -UE, sowie einer modulierenden und regulierenden β -UE, die zu Torfunktion und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals beiträgt (Kaczorowski et al., 1996; Papassotiriou et al., 2000). Die α -UE wird gebildet aus einem Homotetramer von vier α -UEs, die sich jeweils aus sieben transmembranären Segmenten (S0-S6) und vier intrazellulären Segmenten (S7-S10) am C-terminalen Ende zusammensetzen. Als eine Art Spannungssensor fungiert das positiv geladene S4-Segment (Vergara et al., 1998), während die Segmente S5 und S6 nach tetramerer Zusammenlagerung die Kanalpore bilden. Die Ca^{2+} -Aktivierung des Kanals erfolgt über das negativ geladene Verbindungsstück zwischen S9 und S10, auch als ‚ Ca^{2+} -bowl‘ bezeichnet, das für die Ca^{2+} -Sensitivität des $K_{Ca1.1}$ hauptverantwortlich ist (Schreiber & Salkoff, 1997). Das zusätzliche S0-Segment am N-terminalen Ende stellt die Verbindung zur β -UE dar, die aus zwei transmembranären Domänen besteht. Durch Wechselwirkung mit der α -UE moduliert sie die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals, was sich bei Fehlen der β -UE durch eine herabgesetzte

Kanalaktivierung durch Ca^{2+} bemerkbar macht (Tanaka et al., 1997; Brenner et al., 2000; Papassotiriou et al., 2000).

Funktion

Die Funktionen des $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ -Kanals sind vielfältig und abhängig von der jeweiligen Gewebeart. Während er in VSMC den Gefäßtonus reguliert (Köhler et al., 2001), erfüllt der Kanal im Nierenepithel hauptsächlich die Funktion der Kaliumsekretion zur Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase (Pluznick & Sansom, 2006; Grimm & Sansom, 2007; Hebert et al., 2005). In kardialen Fibroblasten trägt er zur Aufrechterhaltung der myokardialen Gewebestruktur und zur funktionellen Aktivität der Herzmuskelzellen durch Transfer elektrischer Signale bei (Wang et al., 2006). In dermalen Fibroblasten wiederum scheint er bei der Antwort auf mechanische, elektrische und chemische Reize involviert zu sein (Stockbridge & French, 1989).

Pharmakologische Eigenschaften

Die Aktivität des $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ -Kanals kann durch eine Reihe pharmakologischer Öffner bzw. Blocker moduliert werden. Iberitoxin (ITX), ein Peptid aus dem Gift des Skorpions ‚*Buthus tamulus*‘ (Galvez et al., 1990; Candia et al., 1992) und Charybdotoxin (CTX) gelten derzeit als die potentesten Inhibitoren des Kanals (Miller et al., 1985; Galvez et al., 1990; Giangiacomo et al., 1992; Candia et al., 1992; Anwer et al., 1993; Gribkoff et al., 1996). Als weiterer Blocker fungiert das Tetraethylammonium, kurz TEA (Anwer et al., 1993; Giangiacomo et al., 1992). Eine aktivitätssteigernde Wirkung durch Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit kann bspw. durch NS1619, ein als Agonist wirkendes Benzimidazolonderivat (Gribkoff et al., 1996) oder durch das Phytotherapeutikum Dehydrosoyasaponin I (DHS I), welches in Ghana als medizinisches Heilkraut verwendet wird, erreicht werden (McManus et al., 1993 & 1995).

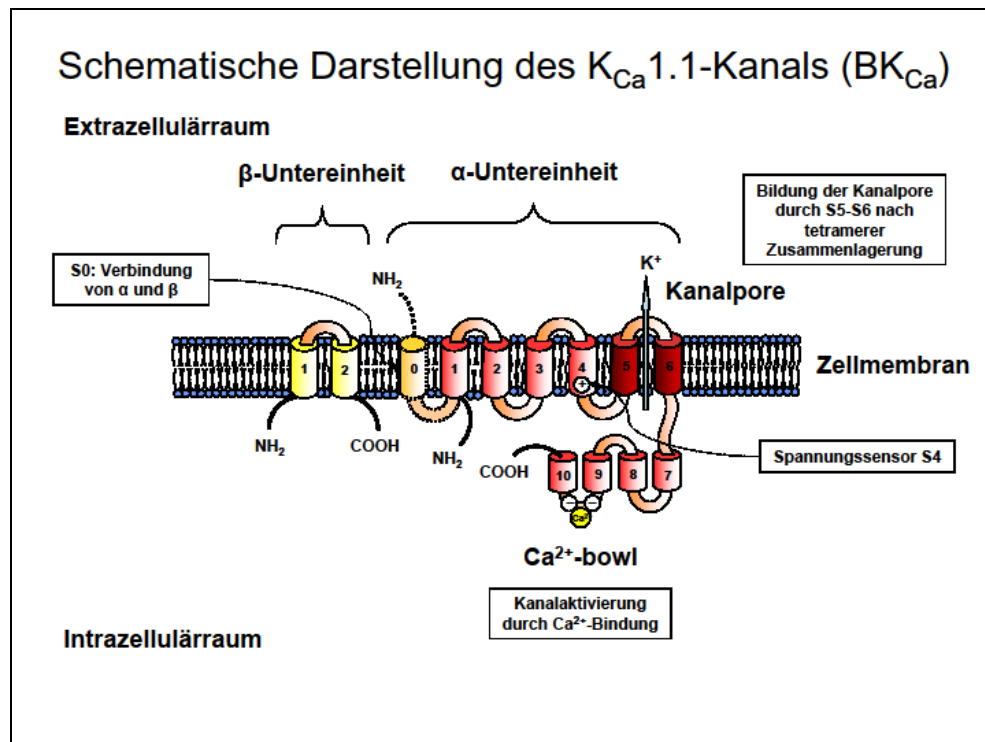


Abbildung 7: Abgebildet ist der molekulare Aufbau des $K_{Ca}1.1$ -Kanals in schematischer Darstellung mit für seine Funktionsweise wichtigen Charakteristika.

1.6 $K_{Ca}2.x$ (SKCa-Kanäle)

Aufbau

$K_{Ca}2.x$ -Kanäle sind spannungsunabhängige K^+ -Kanäle mit einer geringen Einzelleitfähigkeit von ~ 9 -10 pS (Groschner et al., 1992; Hebert et al., 2005). Gemeinsam mit den $K_{Ca}3.1$ -Kanälen weisen sie eine wesentlich höhere Kalziumsensitivität auf mit EC_{50} -Werten im submicromolaren Bereich (Ishii et al., 1997; Latorre et al., 1989). Auch im Aufbau gleichen sie den $K_{Ca}3.1$ -Kanälen (s. Kap. 1.5.1.2 sowie Abb. 3).

Funktion

Basierend auf molekularbiologischen und immunhistochemischen Befunden scheinen $K_{Ca}2.x$ -Kanäle in Neuronen eine wichtige Funktion bei der hier typischen Erregbarkeit zu haben (Wulff et al., 2007; Hosseini et al., 2001; Tacconi et al., 2001; Köhler et al., 1996). Des Weiteren nimmt der $K_{Ca}2.3$ -Subtyp in Endothelzellen Einfluss auf das kardiovaskuläre System (Gauthier et al., 2004; Sheng & Braun, 2007; Groschner et al., 1992). Im Immunsystem spielt seine Beteiligung an der Kalziumsignalgebung eine

wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphocyten (Fanger et al., 2001) wohingegen im Nierenepithel die Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase von Bedeutung ist (Lu & Wang, 2000; Hebert et al., 2005).

Pharmakologische Eigenschaften

K_{Ca}2.x-Kanäle werden durch das Bienengift Apamin sowie durch das alkalische Pfeilgift d-Tubocurarin inhibiert, sind jedoch gegenüber dem K_{Ca}1.1- und K_{Ca}3.1-Blocker CTX und dem K_{Ca}3.1-Blocker CLT unempfindlich (Köhler et al., 1996; Vergara et al., 1998; Blatz & Magleby, 1986; Gauthier et al., 2004). Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften werden die K_{Ca}2.x-Kanäle nochmals in drei Subtypen (K_{Ca}2.1, K_{Ca}2.2, K_{Ca}2.3) unterteilt (Hosseini et al., 2001).

1.7 Erforschung pathophysiologischer Vorgänge in der Niere unter Verwendung des UUO-Modells sowie K_{Ca}3.1- defizienter Mäuse

Die beim Menschen vorliegende Vielfalt der Kaliumkanäle konnte auch bei Mäusen festgestellt werden. Zum Verständnis sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Vorgänge im Zusammenhang mit Kanälen hat sich daher die Verwendung von Knock-out (KO) Mäusen, bei denen jeweils einzelne oder mehrere für einen bestimmten Kanal kodierende Gene ausgeschaltet wurden, als geeignet erwiesen (Barrière et al., 2004).

Für die Erzeugung einer Nierenfibrose im Tierexperiment existiert eine Vielzahl von Möglichkeiten, als effektivstes und somit verlässlichstes Modell konnte sich jedoch meist das UUO-Modell durchsetzen (Zeisberg, Soubasakos et al., 2005; Klahr & Morrissey, 2002). Hierbei handelt es sich um die einseitige Unterbindung eines Ureters (*Unilateral Ureter Obstruction*) mit konsekutivem Harnrückstau in die Niere. Das Modell spiegelt die ablaufenden Prozesse einer obstruktiven Nierenerkrankung beim Menschen bis hin zur Nierenfibrose sehr genau wider (Klahr & Morrissey, 2002; Bascands & Schanstra, 2005). Es stellt dabei jedoch auch

ein extrem aggressives Modell dar, das innerhalb kürzester Zeit (Stunden bis Tage) einen Gewebeschaden anrichtet (Klahr & Morrissey, 2003; Bascands & Schanstra, 2005), der sich bei normalem Krankheitsverlauf innerhalb von Monaten bis Jahren entwickelt.

1.8 Zielsetzung

Die pathophysiologischen Vorgänge bei Nierenfibrose sowie die ihr zugrundeliegenden fibrosefördernden und fibroshemmenden Mechanismen sind seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die Herkunft der fibroseinduzierenden Zelle, des Myofibroblasten, wird dabei bis heute kontrovers diskutiert. Die potentielle Bedeutung von Ionenkanälen bei der Fibroseentstehung ist bislang unzureichend untersucht.

Unumstritten ist die Bedeutung von Fibroblasten bei allgemein entzündlichen Prozessen sowie im Speziellen bei der Nierenfibrose (Ross et al., 1970; Strutz & Müller, 2006; Strutz & Zeisberg, 2006; Le Hir et al., 2005). Essentiell bei dem Versuch der Wiederherstellung von Integrität und Funktion geschädigten Nierengewebes sind dabei Proliferations- und Migrationsprozesse (Tian & Phillips, 2003).

Wie bereits ausgeführt, konnte für $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in verschiedenen Zell- und Gewebetypen eine pathophysiologische Rolle insbesondere bei Krankheitsprozessen, die sich durch eine gesteigerte Proliferationsaktivität auszeichnen, gezeigt werden. Ein Hauptmerkmal der Nierenfibrose ist eine vielfach erhöhte Proliferations- und ECM-Syntheserate von renalen (Myo)-Fibroblasten. In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmals untersucht werden, ob $K_{Ca}3.1$ -Kanäle an der Pathogenese der Nierenfibrose beteiligt sind.

Hierzu sollten im Einzelnen folgende Untersuchungsschritte durchgeführt werden:

i. Etablierung eines Nierenfibrose-Modells für vergleichende *in vivo*-Untersuchungen an Mäusen

Mittels des UUO-Modells sollten zeitgestaffelte Versuchsreihen an Wildtypen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knock-out Mäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) durchgeführt werden.

Des Weiteren sollten in einer vergleichenden Behandlungsstudie $K_{Ca3.1}^{+/+}$ -Mäuse durch pharmakologische Beeinflussung miteinander verglichen werden.

Als Ziel der Untersuchungen galt es, einen möglichen Einfluss des Kanals auf das Fibroseausmaß durch defizienten Kanal bzw. pharmakologische Blockierung festzustellen.

ii. Histologische Analyse mittels PAS- und Masson-Goldner-Färbung, morphometrische Auswertung

Zur Bestimmung des Schadensausmaßes der durch UUO behandelten Nieren sollten diese mit geeigneten Färbungen behandelt, morphometrisch ausgewertet und unter bestimmten Gesichtspunkten miteinander verglichen werden.

iii. Immunhistochemische Analyse

Immunhistochemisch mittels spezifischer Antikörper gefärbtes Kollagen I und III sowie α SMA sollten weitere Aufschlüsse zur Interpretation der histologischen Schnitte liefern.

iv. Molekularbiologische Analyse der $K_{Ca3.1}$ -Expression in fibrotischem Nierengewebe

Mit Hilfe der quantitativen real time-RT-PCR-Methodik sollte auf molekularbiologischer Ebene die $K_{Ca3.1}$ -Expression in den durch UUO fibrosierten Nieren sowie die Expression weiterer, für die Fibroseentstehung bzw. –hemmung wegweisender Parameter bestimmt werden.

Anschließend sollte mittels Western Blot die tatsächliche Proteinproduktion des Kanals überprüft werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien/ Pharmaka

- ABC Kit - VECTASTAIN Elite ABC Kit (Goat IgG): Vector Laboratories; Burlingame; CA; USA
- Agarose (Gelsubstrat): Merck; Darmstadt; D
- Antikörper (Western Blot): Santa Cruz Biotechnology Inc.: Heidelberg; D
- Antiserum (Western Blot): Goat anti-rabbit-Antiserum: GE Healthcare Europe; Freiburg; D
- Aqua ad iniectabilia: Delta Select; Dreieich; D
- Aqua demineralisiert/ Aqua bidestiliert
- Avidin/Biotin Blocking Kit: Vector Laboratories; Burlingame; CA; USA
- Benzamidin: Merck; Darmstadt; D
- Bio-Rad Protein Assay: Bio-Rad; München; D
- Blue QPCR SYBR low ROX; Thermo Scientific; Waltham; MA; USA
- BSA (Albumine Bovine Fraction V, pH 7): Serva; Heidelberg; D
- Citronensäure-Monohydrat: Merck; Darmstadt; D
- Corbit-Balsam: Hecht; Kiel; D
- Diethyl-Pyrocbonat (DEPC): Sigma; Steinheim; D
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP Mix 10 mM): Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- Diethylether: Merck; Darmstadt; D
- DNA ladder (50 bp): Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- DTT (1,4-Dithiothreitol): Merck; Darmstadt; D
- ECL advance Western Blotting detection system: GE Healthcare Europe; Freiburg; D
- EDTA 500 mM: Sigma; Steinheim; D

- Erdnussöl: Apotheke der Charité-Universitätsmedizin; Berlin; D
- Essigsäure: Merck; Darmstadt; D
- Ethanol: Merck; Darmstadt; D
- Ethidiumbromid: Merck; Darmstadt; D
- Formalin 4%: Merck; Darmstadt; D
- Hämatoxylinlösung: Merck; Darmstadt; D
- IHC Zinc Fixative: BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg; D
- Ketanest S (Wirkstoff Esketaminhydrochlorid): Parke-Davis & Pfizer; Karlsruhe; D
- Leupeptin: Merck; Darmstadt; D
- Lichtgrün: Merck; Darmstadt; D
- Loading Buffer: Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- Methanol: Merck; Darmstadt; D
- Natriumchlorid: Merck; Darmstadt; D
- Natrium-Dihydrat: Merck; Darmstadt; D
- Natriumdisulfat: Merck; Darmstadt; D
- Natriumperiodat: Merck; Darmstadt; D
- Natronlauge: Merck; Darmstadt; D
- Oligo dT Primer: Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- Orange G: Merck; Darmstadt; D
- Pararosanilin Certistain: Merck; Darmstadt; D
- PBS ohne Ca^{2+} : Serva Electrophoresis; Heidelberg; D
- Peroxidase Substrat - VECTOR SG Substrate Kit: Vector Laboratories; Burlingame; CA; USA
- Phosphormolybdänsäure: Merck; Darmstadt; D
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid): Merck; Darmstadt; D
- Primärantikörper/ -antiserum:
 - (IHC) Mouse α SMA-Antibody, Klon 1A4, Ig-Fraktion aus Mäuseaszites: Sigma; Taufkirchen; D
 - (IHC) Rabbit anti-mouse Collagen I/III-Antiserum: Biogenesis; Poole; UK
 - (Western Blot) Rabbit anti-mouse $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ -Antibody: Pineda Antibody Services; Berlin; D

- Proteinase K: Merck; Darmstadt; D
- Reverse Transkriptase (DNA-Polymerase): Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- Reaction Buffer 5X: Fermentas; Burlington; Ontario; CDN
- RNA-Isolationskit – High Pure RNA Isolation Kit: Roche; Mannheim; D
 - Lysis/ Binding Buffer
 - DNase I, recombinant, lyophilizate
 - DNase Incubation Buffer
 - Wash Buffer I
 - Wash Buffer II
 - Elution Buffer
 - High Pure Filter Tubes
 - Collection Tubes
- Rompun 2% (Wirkstoff Xylazin hydrochlorid): Bayer; Leverkusen; D
- Salzsäure: Merck; Darmstadt; D
- SDS (Sodium Dodecylsulphat): Merck; Darmstadt; D
- Säurefuchsin: Merck; Darmstadt; D
- Technischer Aceton: Merck; Darmstadt; D
- TESAP (3-Triethoxysilyl-propylamin): Merck; Darmstadt; D
- TRAM-34: UC Davis; CA; USA
- Tris & TrisHCl: Merck; Darmstadt; D
- Trypsin Inhibitor: Merck; Darmstadt; D
- Wasserstoffperoxid: Merck; Darmstadt; D
- Xylol: Merck; Darmstadt; D

TRAM-34 wurde uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Heike Wulff (University of California at Davis, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Geräte/ Zubehör

- Ausbettsschalen (Metall): Sakura; Heppenheim; D
- Brutschrank: Heraeus; Hanau; D
- Cycler: GeneAmp® PCR System 2700: Applied Biosystems; Foster City; CA; USA
- Deckgläser: Menzel; Braunschweig; D
- Digitale Kompaktkamera PowerShot G 6: Canon; Krefeld; D
- Einbettkassetten (Plastik): Sakura; Heppenheim; D
- Elektrophoresekammer & -kamm: Agagel Mini Biometra: Blomed Analytik; Göttingen; D
- Färbeküvetten: Roth; Karlsruhe; D
- Leica Q600: Qwin; Cambridge; UK
- Microtom: Leica Microsystems; Wetzlar; D
- Mikroskope: Axiovert 100; Axiovert 135; ApoTome; Operationsmikroskop: Carl Zeiss MicroImaging; Göttingen; D
- Nahtmaterial:
 - PERMA-HAND SEIDE, 4-0, 6 x 45 cm, steril, nicht resorbierbar: Ethicon; Norderstedt; D
 - PROLENE (Polypropylen), 7-0, 75 cm, steril, nicht resorbierbar: Ethicon; Norderstedt; D
- Objektträger: Menzel; Braunschweig; D
- Operationsbesteck: FST (Fine Science Tools); Heidelberg; D
- PAP Pen Manufactured for Immunotech: Beckmann Coulter; Krefeld; D
- PCR-Plate, Abgene SuperPlate: Thermo Scientific; Waltham; MA; USA
- pH Meter CG 840 B: Schott; Mainz; D
- Pipetten: Finnpiette: Thermo Scientific; Waltham; MA; USA
- Sonstiges Labormaterial: Standardlaborgeräte
- Spritzenzubehör:
 - BD Plastik steril, 1ml Spritze: BD Biosciences; Heidelberg; D
 - BD Microlance 3 steril, 0,45 x 13 mm (braun): BD Biosciences; Heidelberg; D

- BD Microlance 3 steril, 0,9 x 40 mm (gelb): BD Biosciences; Heidelberg; D
- TaqMan-Cycler: 7500 Real Time PCR Systems: Applied Biosystems; Foster City; CA; USA
- Tissue-Tek Embedding console: Vogel; Gießen; D
- Tissue-Tek V.I.P. Gewebeentwässerungs- & Einbettautomat: Vogel; Gießen; D
- Trans-Blot (Nitrocellulose Membran): Bio-Rad; München; D
- Transfektionstubes: BD Biosciences; Heidelberg; D

2.2 Tiere

Generierung der $K_{Ca3.1}$ -Knock-out-Maus

Der Begriff ‚Knock-out‘ bezeichnet eine Technologie, in der eine höchst präzise genetische Veränderung in das Genom – in diesem Fall der Maus – eingeführt wird mit dem Ziel, ein Tiermodell mit einem bestimmten genetischen Defekt zu erzeugen.

Für die $K_{Ca3.1}$ -Knock-out Maus wurde hierfür ein sogenannter ‚gene targeting‘ Vektor, pTV5, in embryonale Stammzellen transferiert, gerichtet gegen Exon4 auf Chromosom 19q13, der chromosomalen Lokalisation des $K_{Ca3.1}$. Genveränderte Stammzellen wurden in Blastozysten überführt und in als ‚Leihmütter‘ fungierende Mäuse reimplantiert. Eine erfolgreiche homologe Integration des pTV5-Vektors in den $K_{Ca3.1}$ -Genlocus konnte mittels PCR-Genprodukt überprüft werden, das in $K_{Ca3.1}^{+/+}$ -Mäusen eine Länge von 160 bp, in $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen dagegen 320 bp aufweist. Eine Weitervererbung des Knock-out-Gens erfolgte letztlich nach den Mendelschen Gesetzen durch Kreuzung von Wildtypen und Knock-out-Mäusen.

Tierhaltung und Fütterung

Alle in dieser Studie verwendeten Tiere wurden in der Tierhaltung des BMFZ mit einer Maximalzahl von sechs Mäusen pro Käfig in ‚individually ventilated cages‘ (IVC) - zur Ermöglichung eines hohen hygienischen Standards - gehalten. Die Käfige wurden temperiert auf $22\pm 2^\circ\text{C}$ und

unterlagen einem Hell-/Dunkel-Zyklus von zwölf Stunden. Die Versorgung der Mäuse erfolgte mit Standard Nagerkost und Wasser ad libitum. Die Tierversuche wurden vom zuständigen Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.2.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Ansatz der Gebrauchslösungen	
Tail-Buffer	
2 M TrisHCl	2,5 ml
500 mM EDTA	0,5 ml
10% SDS	1,0 ml
5 M NaCl	2,0 ml
Millipore-Water	44,0 ml
TE-Buffer	
2 M TrisHCl	0,25 ml
500 mM EDTA	0,1 ml
Millipore-Water	49,65 ml

Tabelle 1: Ansatz der Gebrauchslösungen zur routinemäßigen Genotypisierung der transgenen Mäuse.

Durchführung

Zur routinemäßigen Genotypisierung der Mäuse musste je ein Stück der Schwanzspitze in einem Enzymverdau, bestehend aus 88,8 µl Tail-Buffer und 8,8 µl Proteinase K für 10 Std im Wasserbad bei 55°C und anschließenden 10 Min bei 95°C inkubieren. Im Anschluss daran wurden 400 µl des TE-Buffer hinzugegeben; ab diesem Schritt war eine Konservierung der Proben für 1-2 Wochen bei 4°C möglich.

Die Genotypisierung selbst wurde mittels PCR mit den Primern Kcnn4, Exon4rev und Neorev durchgeführt (s. Tabelle 2). Von den genannten Primern bindet Kcnn4 an das Intron, das vor dem besagten Exon4 liegt, an welches wiederum direkt Exon4rev bindet. Neorev bindet spezifisch an das neoresistente, durch Vektor pTV5 transferierte Gen.

Für die PCR der K_{Ca}3.1-Genotypisierung wurde ein PCR-Mastermix - mit Mengenverhältnissen wie in Tabelle 2 ersichtlich - hergestellt.

Verwendete Primer		
Primer 1	Kcnn4	5'- CTTTGGATCCAGATGTTTCTTGGTGTTAAG- 3'
Primer 2	Exon4rev	5'-GCCACAGTGTGTCTGTGAGG-3'
Primer 3	Neorev	5'-CGTGCAATCCATCTTGTTCA-3'
Mastermix für $K_{Ca}3.1$-Genotypisierung		
H ₂ O	13,25 µl/ tube	
PCR-Buffer	2,5 µl/ tube	
MgCl ₂	2,5 µl/ tube	
dNTP	1 µl/ tube	
Primer 1	1 µl/ tube	
Primer 2	1 µl/ tube	
Primer 3	1 µl/ tube	
Taq Polymerase	0,25 µl/ tube	

Tabelle 2: *Oben:* Verwendete Primer für die routinemäßige Genotypisierung der transgenen Mäuse. *Unten:* PCR-Mastermix zur routinemäßigen Genotypisierung der transgenen Mäuse.

Je PCR-Tube wurden 2,5 µl der jeweils zu bestimmenden DNA mit 22,5 µl des Mastermix pipettiert. Die Reaktion selbst wurde in einem Thermocycler gemäß folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Die Initialisierungs- und Denaturierungsphase zur Trennung der DNA-Stränge erfolgte für 3 Min auf 94°C, darauf folgten 10 Zyklen mit aufeinanderfolgend 35 Sek bei 94°C, 35 Sek bei 58°C und 50 Sek bei 72°C und noch einmal 25 Zyklen nach dem eben genannten Schema mit zusätzlichen 5 Sek Verlängerung je Zyklus. Zum Schluss folgte ein letzter Verlängerungsschritt für 10 Min auf 72°C, eine darauf folgende Dauerschleife konservierte die PCR-Produkte bei 4°C.

Das allgemeine Temperaturschema einer PCR mit der hitzebeständigen Taq-Polymerase basiert auf einer notwendigen DNA-Denaturierung bei 94°C, auf der Primeranlagerung an die DNA-Stränge bei idealerweise 58°C und der DNA-Elongation bei 72°C.

Nach Beendigung der PCR wurde jede Probe mit 4 µl eines Loading Buffers versetzt. Dieser enthält eine Farbsubstanz, zumeist Bromophenol,

und wird zur Präparation von Protein-Proben zur SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese) verwendet. Für die Auswertung der PCR wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt mit 50 ml TAE (Tris EDTA Acetat), 500 mg Agarose und 2,5 µl Ethidiumbromid. Ethidiumbromid ist ein Phenanthridin-Farbstoff, der zwischen den Basen der DNA (oder RNA) interkaliert und dabei sein Anregungsspektrum verändert; seine Fluoreszenz ist bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht, wodurch Stellen mit Nukleinsäure im Agarosegel sichtbar werden. Die Durchführung der Gelelektrophorese ist in Abb. 8a schematisch dargestellt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet; die größeren DNA-Fragmente der KO-Maus mit 320 bp waren daran zu erkennen, dass sie langsamer wanderten und somit eine kürzere Strecke zurücklegten als die 160 bp-Fragmente des Wildtypen (Abb. 8b).

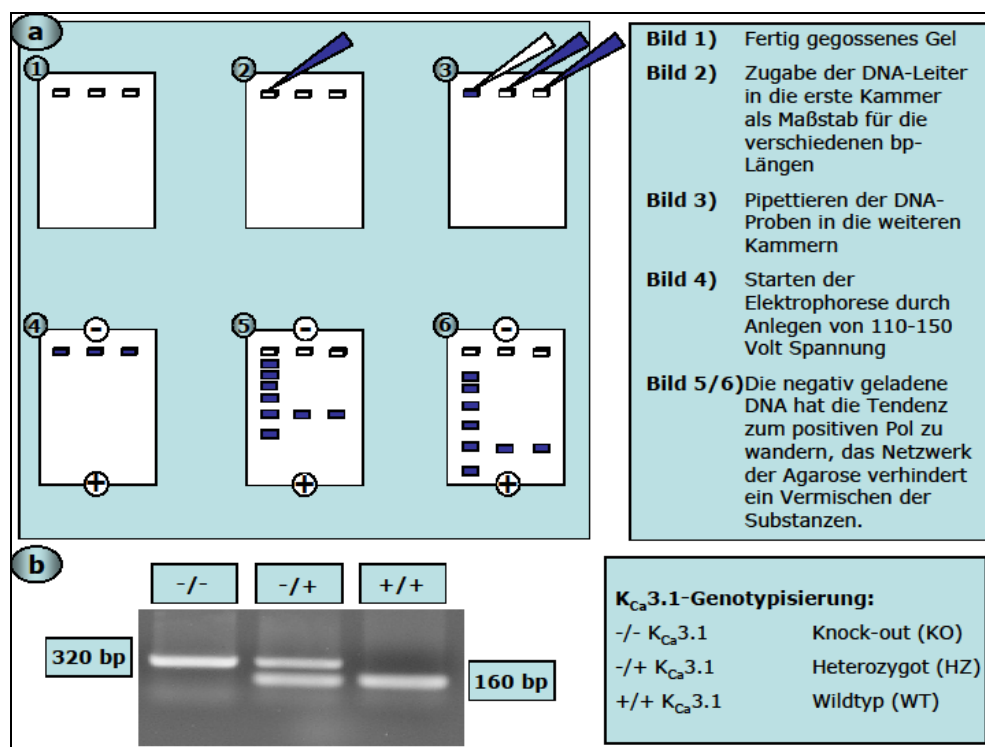


Abbildung 8: a: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Gelelektrophorese mit Beschreibung der einzelnen Schritte. b: Multiplex-PCR für die routinemäßige K_{Ca}3.1-Genotypisierung. Den Wildtyp (+/+) erkennt man an der 160 bp Bande, die Knock-out-Maus (-/-) an der 320 bp Bande. Heterozygote Mäuse (-/+) weisen beide Banden auf.

2.3 Unilaterale Ureter Obstruktion (UUO) – Erzeugung einer Nierenfibrose

Stocklösung der Narkose	
Rompun	0,1 ml
Ketanest	0,2 ml
NaCl	0,7 ml
Verabreichungsschema der Narkose	
10-22 g KG	0,20 ml i.p.
22-32 g KG	0,25 ml i.p.
32-42 g KG	0,30 ml i.p.

Tabelle 3: *Oben:* Stocklösung der Narkose mit gleichzeitiger Schmerzmedikation. *Unten:* Verabreichungsschema der Narkose für die intraperitoneale (i.p.) Applikation.

2.3.1 Operation

Die Mäuse wurden zur Betäubung sowie zur peri- und postoperativen Schmerzlinderung nach dem o.g. Verabreichungsschema durch intraperitoneale Narkosemittelapplikation behandelt. Nach Anästhesiebeginn wurde ein 1,5 - 2 cm langer, mediansagittaler Abdominalschnitt in Haut und Peritoneum gesetzt. Das Peritoneum wurde seitlich fixiert und Teile des Darms in NaCl-getränkten Tüchern ausgelagert, dies sowohl zum Schutz vor Verletzung, als auch zur Vergrößerung des Operationsfeldes mit besseren Sichtverhältnissen. Der linke Ureter wurde aufgesucht und unterhalb des Nierenbeckens sowie oberhalb der Blasenmündung mit einem Faden der Stärke 4-0 durch einen chirurgischen Knoten abgebunden. Anschließend wurde das OP-Feld mit isotoner NaCl-Lösung gespült, Peritoneum und Haut mit einem Faden der Stärke 7-0 wieder verschlossen.

2.3.2 Nachsorge

Die Tiere wurden in Versuchsreihen eingeteilt, innerhalb derer sie miteinander verglichen werden sollten. In beiden Gruppen wurden zeitgestaffelte Versuchsreihen von 14 und 21 Tagen durchgeführt.

Gruppe 1

K_{Ca}3.1^{-/-}-Mäuse (KO) wurden mit K_{Ca}3.1^{+/+}-Mäusen (WT) verglichen, wobei die postoperative Nachsorge für beide Untergruppen gleich war (keine spezielle Behandlung).

Gruppe 2

K_{Ca}3.1^{+/+} wurden durch unterschiedliche Nachbehandlung miteinander verglichen. Einer Untergruppe (Tr) wurde der spezifische K_{Ca}3.1-Blocker TRAM-34 gelöst in Erdnussöl, der anderen Untergruppe (Eö) lediglich das als Vehikel fungierende Erdnussöl verabreicht. Die Applikation erfolgte täglich, um einen konstanten Spiegel aufrechtzuerhalten. Für die Stammlösung des TRAM-34 wurden 24 mg des in Pulverform vorliegenden Produkts in 1 ml Erdnussöl gelöst; um ausgefallenes Pulver wieder in Lösung zu bringen, musste diese vor der täglichen Applikation auf 60-80°C erhitzt werden.

Verabreichungsschema der TRAM-34/ Erdnussöl-Lösung (120 mg/ kg KG)		
25-30 g KG	3,0 mg TRAM-34	0,125 ml Lösung
30-35 g KG	3,6 mg TRAM-34	0,15 ml Lösung
35-40 g KG	4,2 mg TRAM-34	0,175 ml Lösung

Tabelle 4: Mengenverhältnisse zur Herstellung der TRAM-34/ Erdnussöl-Lösung sowie das Verabreichungsschema mit 120 mg/kg KG je nach Gewichtskategorie der Maus.

Die Kontrollgruppe (Eö) bekam nach gleichem Schema eine tägliche Dosis reinen Erdnussöls verabreicht.

2.3.3 Präparation des Untersuchungsmaterials

Nach Ablauf der Zeit wurden die Tiere mit Diethylether in tiefe Narkose versetzt, der Thorax geöffnet und mittels systemischer NaCl-Applikation via rechten Ventrikel eine Blutleere der Organe erzielt. Gemäß Tierschutzgesetz musste anschließend zur Unterbindung jeglicher Zirkulation das Herz herausgeschnitten werden. Es folgte die Öffnung des Abdomens mit Entnahme sowohl der erkrankten als auch der kontralateralen gesunden Niere, welche gewogen und mit einer

Rasierklinge halbiert wurden. Eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt, die andere Hälfte wurde für 24 Std in 4%igem Formalin (verdünnt in Phosphatpuffer PBS bei pH 7,35) konserviert und danach in 70%igem Ethanol ausgewaschen.

2.4 Histologische Analyse

2.4.1 Histologische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Einbetten der Organe

Zur letztlichen Fixierung der Organe in Paraffin mussten die Organe in Kassetten überführt werden, um mittels eines speziellen Programms des ‚Tissue Tek – V.I.P.’-Automaten eine stufenweise Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe zu durchlaufen (Ethanol 70%, 80%, 90%, 2x 100%, 2x Xylol). Darauf folgte eine 4-stufige und 4-stündige Inkubation in flüssigem Paraffin bei 60°C. Im Anschluss daran wurden die Organe in die beheizte Ausbettstation transferiert.

Ausbetten der Organe

Die Organe wurden in flüssiges heißes Paraffin gebettet und zur Überführung des Paraffins in die feste Aggregatform auf einer Kälteplatte ausgelegt.

Silanisieren der Objektträger

Für den Erhalt der kristallinen Struktur der Gewebe und folglich für ein besseres Resultat der späteren Färbung mussten die Objektträger vor dem Schneiden beschichtet werden.

Hierzu wurden die Objektträger in Spüllösung, in demineralisiertem und bidestiliertem Wasser und in 70%igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Es erfolgte die Silanisierung in 2%iger TESAP/Aceton-Mischung (4ml TESAP in 200 ml Aceton) sowie in reinem Aceton mit anschließendem Trocknen bei 42°C im Ofen.

Schneiden der Präparate:

Die Paraffinblöcke wurden mittels Microtom und 40°C warmem bidestillierten Wasser in 3 µm dicke Scheiben geschnitten und auf silanisierte OTs aufgezogen. Diese wurden zunächst auf 40°C vorgetrocknet und anschließend im Ofen 8 Std auf 80°C erhitzt.

2.4.2 Histologische Färbungen

Ansatz der Gebrauchslösungen für Trichrom-Färbung		
Mallory-Rot	Säurefuchsin	1 g
	Orange G	0,4 g
	Aqua dest	300 ml
	Essigsäure	1 ml
Lichtgrün	Lichtgrün	1 g
	Aqua dest	100 ml
	Essigsäure	1 ml
Phosphormolybdänsäure	Wässrige Lösung	1%
Essigsäure-Alkohol	100% Ethanol	99 ml
	Essigsäure	1 ml

Tabelle 5: Ansatz der Gebrauchslösungen für die Trichrom-Färbung (Masson-Goldner-Färbung).

Durchführung der Trichrom-(Masson-Goldner-)Färbung

Zunächst wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (Xylol, Ethanol 100%, 96%, 70%) bis Aqua dest entparaffiniert und darauf folgend 5 Min in Hämatoxylinlösung gefärbt. Anschließend wurden die OTs kurz gebläut und in Aqua dest gewaschen. In den folgenden Schritten folgte die eigentliche MG-Färbung mit 7 Min Färben in Mallory-Rot, 15 Min in Phosphormolybdänsäure und 5 Min in Lichtgrün. Zwischen jedem Färbeschritt wurden die OTs in Aqua dest ausgewaschen. Anschließend wurden die OTs für 5 Min in 100% Ethanol aufbewahrt, dann in Essigsäure-Alkohol bis zu leichter Orangefärbung differenziert und schließlich in Xylol überführt. Mit Corbit wurden nun Deckgläser auf den Schnitten fixiert und die OTs getrocknet.

Ansatz der Gebrauchslösungen für PAS-Färbung		
Schiffs Reagenz	Pararosanilin Certistain	0,5 g
	1 N HCl	15 ml
	Natriumdisulfit	0,5 g
	Aqua dest	85 ml
Periodat Lösung	Natriumperiodat	0,8 g
	Aqua dest	100 ml
Sulfitwasser	10%	10 ml
	Natriumdisulfitlösung	
	1 N HCl	10 ml
	Leitungswasser	200 ml

Tabelle 6: Ansatz der Gebrauchslösungen für die PAS-Färbung (*Periodic acid-Schiff stain*).

Durchführung der PAS-Färbung

Die Schnitte wurden in gewohnter Weise entparaffiniert und rehydratisiert und anschließend für 5 Min in Wasser gespült. Es folgte ein 5-minütiges Einstellen in Periodat Lösung, Spülen in Aqua dest, Einstellen in Schiffs Reagenz für 15 Min, 3-maliges Spülen für 2 Min in Sulfitwasser sowie 10 Min Spülen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Min in Hämatoxylinlösung gefärbt und nochmals 3 Min unter fließendem Wasser gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe überführt und mit einem Deckglas versehen.

2.4.3 Morphometrische Fibrosequantifizierung

Zur histologischen Analyse wurden nun ganze Nierenschnitte, die sowohl die Nierenrinde wie auch das Nierenmark beinhalteten, herangezogen. Die Auswahl der oben erwähnten Färbungen wurde - zum Einen wegen der guten Anfärbbarkeit von fibrotischem Gewebe mit MG-, zum Anderen wegen der guten Beurteilbarkeit der Integrität der Basalmembran mittels PAS-Färbung - getroffen.

Zum Vergleich der Nierenschnitte wurde ein Score definiert. Dieser beinhaltete bei einer Vergrößerung mit dem 40x-Objektiv (400x Vergrößerung) folgende Einteilung:

0 – kein Schaden

1 – fokaler Schaden

2 – diffuser Schaden

Für einzelne Areale wurde ein jeweils spezifischer Index, gemessen an dem dort vorrangig vorhandenen Schädigungsgrad, definiert. Der totale tubulointerstitielle Schaden wurde anschließend berechnet als die Summe der spezifischen Schadenindices, wobei der Index von Arealen mit vorrangig fokalem Schaden und Schädigungsgrad 1 mit 1 multipliziert, der Index von Arealen mit diffusem Schaden und Schädigungsgrad 2 mit 2 multipliziert wurde.

Ferner wurden die histologischen Befunde in akuten und chronischen tubulointerstitiellen Schaden unterteilt. Für den akuten Schaden galten folgende Kriterien: Ausdünnung des Bürstensaums, Ausdünnung des Tubulusepithels, Abtragung der tubulären Basalmembran mit oder ohne interstitiellem Ödem. Kriterien zur Diagnose eines chronischen tubulointerstitiellen Schadens waren hingegen: Verbreiterung der tubulären Basalmembran, abgeflachtes Tubulusepithel, Tubuluszellatrophie, Anstieg der interstitiellen Matrix bis hin zur Fibrose.

Zusätzlich wurde eine morphometrische Analyse mit Hilfe eines halbautomatischen Systems zur Bildanalyse (Leica Q600) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 20 Rindenareale in 200x Vergrößerung (20x Objektiv) bezüglich ihres Anteils an differenzierten proximalen Tubuli nach Ausschluss der Glomeruli untersucht. Ebenso wurde die Breite des Nierenparenchyms an 4 verschiedenen Punkten gemessen und der Mittelwert \pm Standardabweichung für jeden Nierenschnitt angegeben.

Die histologischen Untersuchungen wurden in freundlicher Kooperation mit Prof. Dr. med. H.-J. Gröne, Professor für Experimentelle Pathologie an der Universität Heidelberg und Abteilungsleiter im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, durchgeführt.

2.5 Immunhistochemische Analyse des α SMA- und Collagen I/III-Expressionsmusters in fibrotischem Nierengewebe

Ansatz der Gebrauchslösungen für IHC	
Stammlösung A	
0,1 M Citronensäure	21,01 g Citronensäuremonohydrat in 1000 ml Aqua bidest
Stammlösung B	
0,1 M Natriumcitrat	29,41 g Natrium-Dihydrat in 1000 ml Aqua bidest
0,1 M Natriumcitratpuffer pH 6,0	
Stammlösung A	54 ml
Stammlösung B	246 ml
Aqua bidest	700 ml
5% BSA	15 g BSA in 300 ml PBS (ohne Ca^{2+})
1% BSA	3 g BSA in 300 ml PBS (ohne Ca^{2+})
0,5% BSA	30 ml 5% BSA in 270 ml PBS (ohne Ca^{2+})

Tabelle 7: Ansatz der nötigen Gebrauchslösungen für die immunhistochemische Analyse.

Durchführung der Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie (IHC) wurde eine Nierenhälfte in einer speziellen Zinklösung (IHC Zinc Fixative) vorbehandelt, welche eine mildere Fixierung als Formalin gewährleistet und somit ein besseres immunhistochemisches Ergebnis liefert.

Für die immunhistochemische Analyse wurde ein mouse anti- α smooth muscle (α SMA)-Antikörper (Klon 1A4, Ig-Fraktion aus Mäuseaszites-Flüssigkeit) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet sowie ein rabbit anti-mouse collagen I/III-Antiserum in der Verdünnung 1:20. Als Kontrolle wurden Schnitte unter Aussparung des Primärantikörpers bzw. durch Ersetzen des Primärantikörpers durch ein nicht-immunes IgG angefertigt, welche am Ende der IHC eine negative Färbereaktion ergaben. Zur

Visualisierung wurde ein ABC-Kit verwendet. Die Analyse erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen.

Tag 1

Wie schon bei der MG-Färbung wurde auch die IHC an Paraffinschnitten durchgeführt. Zunächst mussten die auf OTs fixierten Paraffinschnitte in der absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert werden, wie aus Tabelle 8 ersichtlich:

Absteigende Alkoholreihe für IHC	
Xylol 1/ 2/ 3	jeweils 10 Min
Ethanol 100%	10 Min
0,15% H ₂ O ₂ in Methanol (Peroxidaseblock)	30 Min
Ethanol 100%	5 Min
Ethanol 96%	5 Min
Ethanol 80%	5 Min
Ethanol 70%	5 Min

Tabelle 8: Schema der absteigenden Alkoholreihe für die Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte inklusive des Peroxidaseblocks.

Der als Peroxidaseblock beschriebene Zwischenschritt mit Wasserstoffperoxid galt der Blockierung endogener, also im Nierengewebe befindlicher Peroxidase. Anschließend wurden die OTs in Aqua bidest gewaschen. In der Zwischenzeit wurde ein 0,01 M Natriumcitratpuffer mit pH 6,0 hergestellt. pH-Ausbesserungen wurden auf $\pm 0,1$ mit NaOH bzw. HCl vorgenommen. Der Puffer wurde aufgekocht, um anschließend die OTs darin bei 92-95°C für 14 Min zu inkubieren. Zweck des Citratpuffers ist der Nachweis schwach exprimierter Proteine. Durch Erhitzen des Puffers werden Proteine sowie andere Zellbestandteile denaturiert, was dem Antikörper den Weg in die Zelle und zu seinem Antigen erleichtert. Die Präparate wurden anschließend in Aqua bidest gewaschen.

Rings um die Schnitte konnte mit Saugpumpe und PAP Pen, einem Stift mit hydrophober Flüssigkeit, durch Umrandung eine Art

Inkubationskammer für im Folgenden aufzutragende Substanzen geschaffen werden.

Es folgte eine Inkubation der OTs zunächst in 5%igem BSA für 30 Min, anschließend in 1%igem BSA ebenfalls mit dem Zweck, unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren.

Aufgrund der späteren Verwendung gelabelter Avidinreagenzien (ABC Kit) und dem Tatbestand, dass sich in Nierengewebe ein hoher Anteil an endogenem Biotin befindet, musste dieses vorher geblockt werden. Mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit wurde zunächst 30%iges Avidin, verdünnt in 1%igem BSA, auf die Schnitte aufgetragen und für 20 Min in einer feuchten Kammer inkubiert; es folgte nach Waschen mit Aqua bidest und Zwischenlagern in 1%igem BSA ein ebensolcher Inkubationsschritt mit 30%igem Biotin.

Primärantikörper bzw. Antiserum wurden in ihrer jeweiligen Verdünnung in 1%igem BSA auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tag 2

Zunächst wurden die OTs mit Primärantikörper/ Antiserum noch für 1 weitere Std bei 37°C inkubiert, anschließend in Aqua bidest und PBS gewaschen und in 0,5%igem BSA für 5 Min inkubiert.

Der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:200, verdünnt in 1%igem BSA, auf die Schnitte aufgetragen und 45 Min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auch nach diesem Schritt folgten Waschschrte in Wasser und PBS sowie Zwischenlagerung in 0,5%igem BSA.

Das im nächsten Schritt verwendete ABC Kit hatte ein Mischungsverhältnis von 20 µl A-Reagenz und 20 µl B-Reagenz in 1 ml 1%igem BSA und musste vor der Anwendung 30 Min bei RT vorinkubieren. Die Zusammenstellung des ABC Kits beruht auf seiner Reaktionsweise:

Das Avidin (A), ein zum Vitamin Biotin höchstaffines Glykoprotein, bildet mit dem biotinylierten Enzym Peroxidase (B) einen Komplex (C), der

mindestens eine weitere Biotin-Bindungsstelle aufweist, um an den biotinylierten Sekundärantikörper zu binden.

Nach Präinkubation musste das Kit auf die Schnitte aufgetragen und 30 Min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Es folgte wiederum ein ausgiebiger Waschschrift in Aqua bidest und PBS.

Zur Sichtbarmachung der gebundenen Strukturen diente das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), das durch Reaktion mit der biotinylierten Peroxidase des ABC-Komplexes ein braunes Endprodukt liefert.

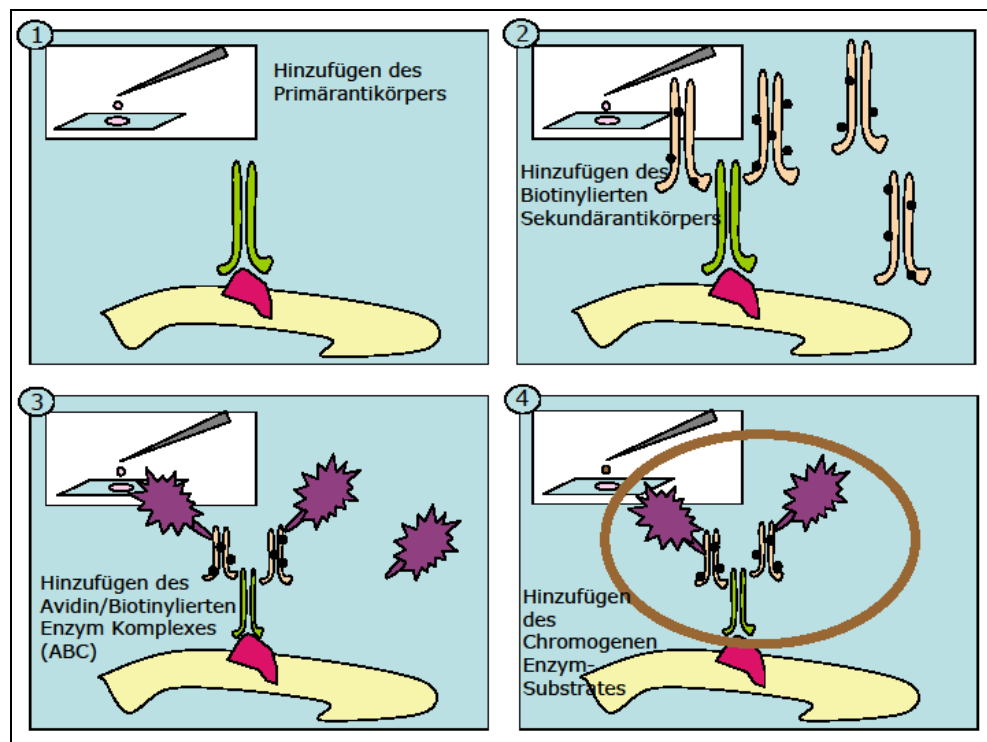


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ablaufenden Schritte in der IHC. *Bild 1:* Bindung des Primärantikörpers an das Antigen. *Bild 2:* Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. *Bild 3:* Bindung des ABC-Komplexes mittels Avidin am biotinylierten Sekundärantikörper. *Bild 4:* Bindung des Chromogens DAB an der biotinylierten Peroxidase und Sichtbarmachung (braune Färbung) durch enzymatische Reaktion.

Nach der Färbungsreaktion folgten ausreichendes Abwaschen des Substrates, Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe gemäß Tabelle 9 und Aufbringen von Deckgläsern auf die OTs.

Aufsteigende Alkoholreihe für IHC	
Ethanol 70%	5 Min
Ethanol 80%	5 Min
Ethanol 96%	5 Min
Ethanol 100% (1/ 2/ 3)	5 Min
Xylol (1/ 2/ 3)	10 Min

Tabelle 9: Schema der aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung der Gewebeschnitte nach Abschluss der Immunhistochemie.

2.5.1 Morphometrische Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung der IHC wurde in 10 High Power Fields (HPF) im tubulointerstitiellen Gewebe bei 400x Vergrößerung (40x Objektiv) die Anzahl an Zellen gezählt, welche für den entsprechenden Marker eine positive Färbereaktion aufwiesen. Das Ausmaß der kollagenen Anfärbbarkeit wurde wiederum in einem Score erfasst:

0 – keine Färbung

1 – geringfügige Färbung

2 – mäßige Färbung

3 – Starke Färbung

Der Auswertungsindex für die IHC wurde wie bereits bei der histologischen Analyse zum tubulointerstitiellen Schaden berechnet. D.h. es wurden Indices für einzelne Bereiche und ein Summationsindex erstellt und schließlich die jeweiligen Ergebnisse mit dem entsprechenden Wert multipliziert (1x1 / 2x2 / 3x3).

2.6 Molekularbiologische Analyse des K_{Ca}3.1-Expressionsmusters in fibrotischem Nierengewebe

Zur molekularbiologischen Analyse mittels Taq-Man™-real time-RT-PCR war zunächst das Isolieren der mRNA aus den bereits gewonnenen Organproben und darauf folgend das Umschreiben in cDNA notwendig.

2.6.1 mRNA-Isolation

Zur Extraktion von mRNA wurden die gefrorenen Nierenhälften in Transfektionstubes zusammen mit 200 µl PBS (ohne Ca^{2+}) sowie 400 µl Lysis/Binding Buffer geschräddert, bis lediglich eine homogene weiße Schaummasse übrig blieb. Diese wurde bei 4°C und 2.000 rpm abzentrifugiert zu einem klaren braunrötlichen Lysat. Der Lysis/Binding Buffer hat hierbei die Aufgabe, durch chaotropische Salze sowie Detergenzien die Probe zu lysieren und gleichzeitig RNase zu inaktivieren. Das entstandene Lysat wurde in Filter- & Collection-Tubes überführt und bei 10.000 rpm 15 Sek zentrifugiert. Hintergrund hiervon ist, die Fähigkeit der Nukleinsäure in Anwesenheit von chaotropischen Salzen an das Glasfaservlies der High Pure Filter zu binden, resultierend in einer Immobilisation von RNA sowie DNA, während andere mögliche Kontaminatoren hindurch gelassen werden.

Um die noch fixierte DNA zu entfernen wurden die Proben mit einem Enzymverdau versetzt, bestehend aus 90 µl DNase-Inkubationspuffer und 10 µl DNase. Dieser inkubierte 15 Min bei RT. Im Anschluss daran folgten drei Waschschrte, zunächst mit 500 µl Wash Buffer I, welcher bei 10.000 rpm abzentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen wurde, es folgte der gleiche Vorgang mit 500 µl Wash Buffer II und noch einmal mit 200 µl Wash Buffer II, hierbei nun aber mit 2-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Ziel des Waschvorgangs war das Durchlassen der Kontaminatoren wie Salze, Proteine und verdauter DNA bei gleichzeitigem Zurückhalten der mRNA.

Als letzter Schritt in der mRNA-Isolation musste die mRNA aus dem Vlies gelöst und aufgefangen werden. Hierzu wurden die Proben mit 70 µl Elution Buffer versetzt und 1 Min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das reine mRNA enthaltende Filtrat wurde in sterilen Eppendorfgefäßen gesammelt und sofort auf Eis gelegt.

2.6.2 cDNA-Transkription

Für die Transkription der mRNA in cDNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion mit Reverser Transkriptase (RT-PCR) angewendet. Hierfür wurden jeweils 10 µl mRNA mit 1 µl oligo dT, durch Thyminbasen komplementär zum Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA und somit als

Primer fungierend, für 5 Min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Im folgenden Schritt musste jede Probe mit 4 µl RT Buffer, 2 µl 10 mM dNTP sowie 2 µl DEPC-Wasser versetzt werden und 5 Min bei 37°C im Thermocycler inkubieren. Die dNTPs (Desoxy-Nukleosidtriphosphate) sind die Bausteine, aus denen die zu transkribierende cDNA zusammengesetzt wird, der Zusatz des Diethyl propylcarbonats (DEPC) zum Wasser soll darin befindliche RNase inaktivieren. Im letzten Schritt wurde das Enzym der Reaktion, 1 µl Reverse Transkriptase, hinzugefügt. Durch Inkubation im Thermocycler bei zunächst 42°C für 60 Min und anschließenden 70°C für 10 Min wurde die DNA-Kopie der vorliegenden mRNA erstellt. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.6.3 Quantitative Taq-Man™-real time-RT-PCR

Verwendete Primer für real time-RT-PCR		
Primernamen	GenBank-Nr.	Sequenzen der Primer
mK_{Ca}3.1	NM_008433	Sense: F5'- GTGTTTGATCACCTGTCCA-3' Antisense: R5'- GGAGCCCGTTGTCAGTCA-3'
mK_{Ca}1.1	NM_010610	Sense: F5'- AGCGTCCTGGACTCACTCAT-3' Antisense: R5'- GAGCCTCGAGCTCTGGTGT-3'
mK_{Ca}2.3	NM_080466	Sense: F5'- CCATGCCAAAGTCAGGAAAC-3' Antisense: R5'- CATCTTGACACCCCGAAGTT-3'
mGAPDH	NM_008084	Sense: F5'- CAATGAATACGGCTACAGCAAC-3' Antisense: R5'- AGGGAGATGCTCAGTGTTGG-3'
mFSP-1	NM_011311	Sense: F5'- TGAACAAGACAGAGCTCAAGGA-3' Antisense: R5'- TGCAGGACAGGAAGACACAG-3'

murine α-SMA	NM_007392	Sense: F5'- AATGGCTCTGGGCTCTGTAA-3' Antisense: R5'- CTCTTGCTCTGGGCTTCATC-3'
mCollagen type I	NM_007742	Sense: F5'- GAACCCCAAGGAAAAGAAGC-3' Antisense: R5'- GCTACGCTGTTCTTGCACTG-3'
mCollagen type III	NM_009930	Sense: F5'- AGGCTGAAGGAAACAGCAAA-3' Antisense: R5'- TCAGGACCCCAATGTCATA-3'
mTGFB1	NM_011577	Sense: F5'- ACCGGAGAGCCCTGGATAC-3' Antisense: R5'- AGGGTCCCAGACAGAAGTTG-3'

Tabelle 10: Namen und Sequenzen der für die TaqMan™-real time-RT-PCR verwendeten Primer.

Bei der Taq-Man™-real time-RT-PCR handelt es sich um eine Polymerase-Kettenreaktion, die neben einer qualitativen zusätzlich eine (semi)quantitative DNA-Bestimmung und somit indirekt eine mRNA-Expressions-Bestimmung ermöglicht.

Die Quantifizierung erfolgte mittels fluoreszierender Farbstoffe, deren Fluoreszenz dabei proportional zum DNA-Gehalt anstieg. Für die qualitative und quantitative Bestimmung der mRNA-Expression in dem jeweiligen Gewebe war es zuvor nötig, die mRNA zu isolieren und mittels Reverser Transkription in eine stabile cDNA umzuschreiben, wie in den vorherigen Schritten beschrieben.

Vor Beginn der Taq-Man™-real time-RT-PCR wurden die in der Reaktion zu verwendenden Primer festgelegt. Als endogene Kontrolle wählten wir die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), da sie bereits in der Literatur verankert ist als so genanntes ‚housekeeping-gene‘ für eine relative Quantifizierung bei real time-RT-PCR, unbeeinflusst durch spezifische Behandlungen (Haufe et al., 2001; Koewenhoven et al., 1999).

Relative Quantifizierung und endogene Kontrolle wurden bei der Programmierung festgelegt.

Je Probe wurden 2 µl cDNA pro Primerpaar benötigt. Für jedes Primerpaar musste ein Mastermix hergestellt werden mit 2x(n+1)µl Forward Primer, 2x(n+1)µl Reverse Primer, 4x(n+1)µl Aqua ad iniectabilia und 10x(n+1)µl Blue QPCR SYBR low ROX. „n“ stellte die Anzahl der zu bestimmenden Proben dar, einschließlich einer Negativ-Kontrolle ohne cDNA. Letztlich befand sich in den Wells also ein Template-Volumen von 20 µl.

Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte dann in aufeinander folgenden Reaktionszyklen, wobei die Zyklen zum Teil in sich noch einmal unterteilt waren:

Die ersten beiden Zyklen dienten der Initialisierung. Nach einer 2-minütigen Phase bei 50°C wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 95°C sichergestellt, dass die gesamte doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen getrennt und die Polymerase aktiviert war. Der dritte Zyklus - bestehend aus 15 Sek bei 95°C zur Initialisierung, 1 Min bei 60°C zur Anlagerung der Primer an die DNA-Sequenzen sowie der Elongation der Sequenzen durch die DNA-Polymerase - wurde 50 mal wiederholt.

Das Charakteristische der Taq-ManTM-real time-RT-PCR ist, dass sowohl der Nachweis als auch eine zeitgetreue Amplifikation des PCR-Produktes in einem Reaktionsgefäß möglich sind. Die Quantifizierung wird dabei am Ende eines jeden Zyklus, genauer in der Anlagerungs- und Verlängerungsphase durchgeführt - daher auch der Name ‚real time‘. Als fluorogener Farbstoff können interkalierende, also sich in die DNA einlagernde Farbstoffe, oder aber - wie in diesem Fall - FRET-Sonden (Fluorescence resonance energy transfer) verwendet werden. Bei der Taq-Man-Methodik macht man sich die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze. Es wird hierfür eine spezielle FRET-Sonde benötigt, an deren 5'-Ende sich ein fluoreszierender sog. Reporter-Farbstoff (Donor-Fluorochrom; Fluoreszein-Derivat; FAM) befindet, während das 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Akzeptor-Fluorochrom; Rhodamin-Derivat; TAMRA) markiert ist. Wird nun die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so gibt das Donor-Fluorochrom einen Teil seiner Energie an das in ausreichender Nähe

befindliche Akzeptor-Fluorochrom ab, welches dabei die Fluoreszenz supprimiert. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern an der Matrize. In der folgenden Verlängerungsphase kommt die Taq-Polymerase in Kontakt mit der Sonde und verdrängt diese. Durch die dabei entstehende y-förmige Struktur wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert, und sie beginnt, neben der Synthese des Gegenstranges das 5'-Ende der Sonde abzubauen. Hierdurch entfernen sich Reporter und Quencher zunehmend, der Fluorescence resonance energy transfer nimmt ab, die Fluoreszenz des Donors jedoch zu. Freie, nicht-hybridisierte Sonden werden von der Taq-Polymerase nicht hydrolysiert.

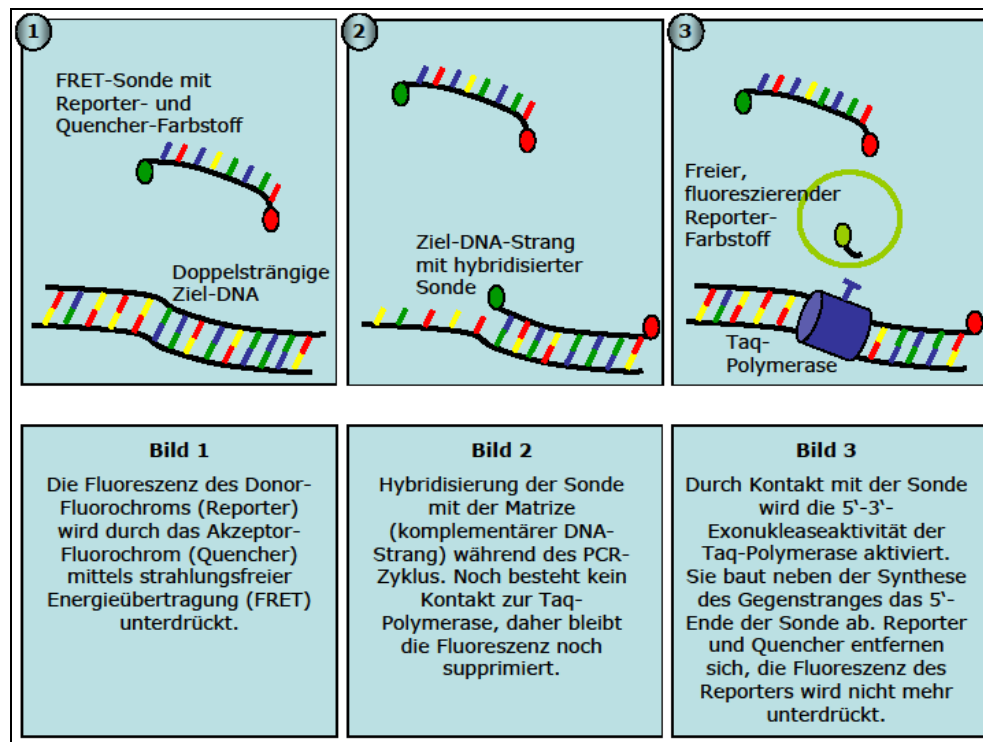


Abbildung 10: Funktionsweise der TaqMan-Sonde ,im Reagenzglas' mit Erläuterungen zu den einzelnen Bildabschnitten.

Gemessen wird also eine während der PCR-Zyklen zunehmende Fluoreszenz, die sich in drei Phasen einteilen lässt:

Während der ersten Phase ist die Templatmenge zu gering, sodass Template, Primer und Polymerase nur wenig aufeinander treffen. Während der zweiten Phase zeigt sich dann ein exponentieller Anstieg der Produkte, wobei die Zunahme des PCR-Produktes von Zyklus zu Zyklus mit der Zunahme der Fluoreszenz korreliert. Die Fluoreszenz übersteigt hier durch

ihren gleichsam exponentiellen Anstieg signifikant die Hintergrundfluoreszenz. In der dritten Phase befinden sich dann zu viele Produkte in der Probe, sodass Produktfragmente miteinander hybridisieren, Substrate verbraucht und Polymerase und Nukleotide durch die Hitze zerstört werden.

Das durch die Fluoreszenz entstehende Signal ist dabei streng sequenzspezifisch, da nicht vollständig gebundene Sonden verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Die zeitgetreue Alteration der Fluoreszenz wird mittels eines Sequenzen-Detektionssystems im geschlossenen Reaktionsgefäß von Zyklus zu Zyklus erfasst.

Bei der Auswertung der gemessenen Werte ermöglichte die vergleichende Ct-Methode eine relative Quantifizierung. Hierfür musste mit Hilfe der Taq-Man-Auswertungs-Software zunächst für jede Reaktion ein Schwellen- oder Ct-Wert (threshold cycle = Schwellenzyklus) bestimmt werden. Als Ct-Wert galt der gemessene Punkt, an dem die sequenzspezifische PCR-Reaktion in die exponentielle Phase überging und sich die Fluoreszenz eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz abhob. Zusätzlich zum Ct-Wert wurde in jeder Probe die Expression der endogenen Kontrolle - wie bereits erwähnt GAPDH - zur relativen Erfassung der jeweiligen Genexpression bestimmt. Für die relative Erfassung musste die Differenz ΔCt des jeweiligen Ct-Wertes, z.B. des $K_{Ca3.1}$, zum Ct-Wert der GAPDH derselben Probe berechnet werden:

$$Ct_{KCa3.1} - Ct_{GAPDH} = \Delta Ct.$$

Um die Veränderung der zu untersuchenden Genexpressionen zu erfassen - also Behandlung versus Scheinoperation oder Knock-out-Maus versus Wildtyp - wurde der $\Delta\Delta Ct$ -Wert ermittelt, indem der ΔCt -Wert der Kontrolle von dem Wert der zu vergleichenden Proben subtrahiert wurde:

$$\Delta Ct_{WT \text{ oder } KO} - \Delta Ct_{Schein-OP \text{ oder } WT} = \Delta\Delta Ct.$$

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die mittleren Ct-Werte der zu vergleichenden Gruppen wurden mittels ungepaartem t-Test verglichen und P-Werte $< 0,05$ als signifikant erachtet.

2.7 Nachweis des K_{Ca}3.1-Proteins mittels Western Blot

Um über den molekularbiologischen Nachweis der verstärkt exprimierten mRNA hinaus auch eine erhöhte Expression des K_{Ca}3.1-Kanalproteins detektieren zu können, wurde der Western Blot durchgeführt. Er bietet die Möglichkeit, mit Hilfe von Antikörpern bestimmte Antigene (Proteine) nachzuweisen.

Zu Beginn wurde das Gewebe frisch entnommener Mäusenieren in einem Homogenisierungspuffer homogenisiert. Dieser enthielt bei einem pH von 8,0 folgende Bestandteile: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,2 µM Benzamidin, 50 mM Leupeptin, 0,5 mM PMSF und 0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor. Anschließend wurden durch Zentrifugation bei 1000 rpm über 2 Min feste Restbestände separiert und verworfen. Membranproteinfraktionen erhielt man mittels Zentrifugation bei 20.000 rpm für 45 Min, welche anschließend mit Homogenisierungspuffer wieder in Lösung gebracht und unter Anwendung des Bio-Rad Protein Assays quantifiziert wurden. Letzterer enthält den Farbstoff Coomassie, mit welchem unspezifisch die totale Proteinkonzentration gemessen werden kann. Es folgten elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen mittels Trägermatrix SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran, sowie das Blockieren freier Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% fettfreiem Milchpulver gelöst in TBST (bestehend aus 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20 bei pH 7,5) bei Raumtemperatur. Für das nun spezifische Erfassen des K_{Ca}3.1-Kanalproteins wurde ein rabbit anti-mouse K_{Ca}3.1-Antikörper verwendet, der sich gegen 28 am N-Terminus des Kanals befindliche Aminosäuresequenzen richtet. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen, über Nacht inkubiert und anschließend von der Membran abgespült. Es folgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem goat anti-rabbit-Antiserum (Verdünnung 1:10.000) und das Sichtbarmachen immunmarkierter Proteine mittels eines ECL advance Western Blotting Detektionssystems. Ob die Proteine die gleiche Ladung trugen, wurde durch Ablösen und nochmaliges Untersuchen der Western Blots mit einem anti-β-adaptin-Antikörper (Verdünnung 1:200) validiert.

2.8 Pharmakokinetik von TRAM-34 in Mäusen mittels Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie

Die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der AG Prof. Wulff in Davis, Ca, USA durchgeführt.

Die Koppelung von Flüssigkeitschromatographie (LC oder HPLC) und Massenspektrometrie (MS) dient zur Auftrennung (via LC) sowie zur gleichzeitigen Identifikation und Quantifizierung (via MS) von Substanzen. Um zu überprüfen, ob durch eine Dosis von 120 mg/kg KG TRAM-34 pro Tag ein ausreichender Wirkungsspiegel erreicht wird, wurde eine 1-malige intraperitoneale Applikation von TRAM-34 gemäß der bereits unter Punkt 2.3.2 genannten Applikationsdosis vorgenommen. In tiefer Ethernarkose folgten Blutentnahmen aus dem rechten Ventrikel zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5/ 1/ 2/ 4/ 12/ 24 Std) nach i.p. Applikation. Durch Zentrifugation wurde das Plasma separiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Plasmaproben wurden durch C18 SPE (solid phase extraction) Filterpatronen gereinigt, unter Stickstoff durch Verdampfung getrocknet und in Azetonitril (Methylcyanid) aufgelöst. Die LC/MS wurde durchgeführt mittels einer Hewlett-Packard HPLC-Anlage 1100, ausgerüstet mit einer Merck KGaA RT 250-4 LiChrosorb RP-18 (Reversed Phase) Säule, welche wiederum gekoppelt war an eine Finnigan LCQ Classic MS. Bei dieser Art der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie wird das zu analysierende Stoffgemisch mit Hilfe von Flüssigkeit (mobile Phase) aus der stationären Phase in einer Säule ausgewaschen, was bei verschiedenen Stoffen unterschiedlich schnell geschieht. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus Azetonitril/ Wasser mit 0,2% Methansäure. Zur chromatographischen Auftrennung wurde eine Flussrate von 1 ml/Min gewählt, woraufhin der Gradient innerhalb der ersten 5 Min von 20/80 auf 70/30, innerhalb von 11 Min auf 80/20 hinauf lief. TRAM-34 konnte nach einer Retentionszeit von 14,4 Min (Zeit von Beginn der Analyse bis zur Detektion des Peaks) bei 30°C aus der Säule gewaschen und mittels MS und eines Detektors mit variabler Wellenlänge bei 190 nm erfasst und quantifiziert werden. Als interner Standard wurde das strukturell verwandte TRAM-46 verwendet, das gemeinsam mit TRAM-34 ausgewertet und in

Relation dazu die zu messende Konzentration von TRAM-34 berechnet wurde.

2.9 Statistische Analysen

Sämtliche Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SE) des Mittelwertes angegeben. Für den Vergleich von Gruppen und Untergruppen wurde der ungepaarte t-Test angewendet. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant, P-Werte $<0,01$ als hochsignifikant und P-Werte $<0,001$ als höchstsignifikant erachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Histologische Auswertung der Mäusenieren nach Fibroseinduktion durch UUO im Knock-out-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des UUO-Modells durch Abbinden des Ureters in Mäusenieren eine Fibrose induziert. Um einen möglichen Einfluss des $K_{Ca}3.1$ -Kanals auf die Entwicklung und Progression einer Fibrose zu untersuchen, verwendeten wir zunächst das Knock-out Modell mit $K_{Ca}3.1$ -defizienten Mäusen. Es wurden Ausmaß und Stadium der fibrotischen Zerstörung - wie bereits in Kapitel 2 beschrieben - an gleichgeschlechtlichen und altersgleichen Knock-out-Mäusen ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) sowie Wildtypen ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) verglichen. Die Tiere wurden 14 Tage nach der UUO-Operation geopfert.

3.1.1 Tubulointerstitielle Schädigung

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben wurden Grad bzw. Ausmaß der Nierenschädigung sowie eine Differenzierung in akute bzw. chronische tubulointerstitielle Schädigung mittels PAS- und Masson-Goldner-Färbung sowie Erstellung von Score-Werten und verrechneten Indices untersucht. Insbesondere die PAS-Färbung brachte beträchtliche Ergebnisse hervor. Hier zeigten sich Zeichen eines chronischen Nierenschadens, so z.B. die Verbreiterung der tubulären Basalmembran, Tubuluszellatrophie und Anstieg der extrazellulären Matrix, in UUO-Nieren von $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen bei einem Score von $44,0 \pm 6,0$ und waren damit um rund 48% reduziert im Vergleich zu den Werten der UUO-Nieren von $K_{Ca}3.1^{+/+}$ Mäusen (Score $84,4 \pm 12,9$; $p = 0,009$). Subchronische sowie akute tubulointerstitielle Schäden erwiesen sich - anders als die chronischen Schäden - als relativ vergleichbar mit nur geringen, nicht signifikanten Unterschieden zwischen Wildtypen und Knock-out-Mäusen.

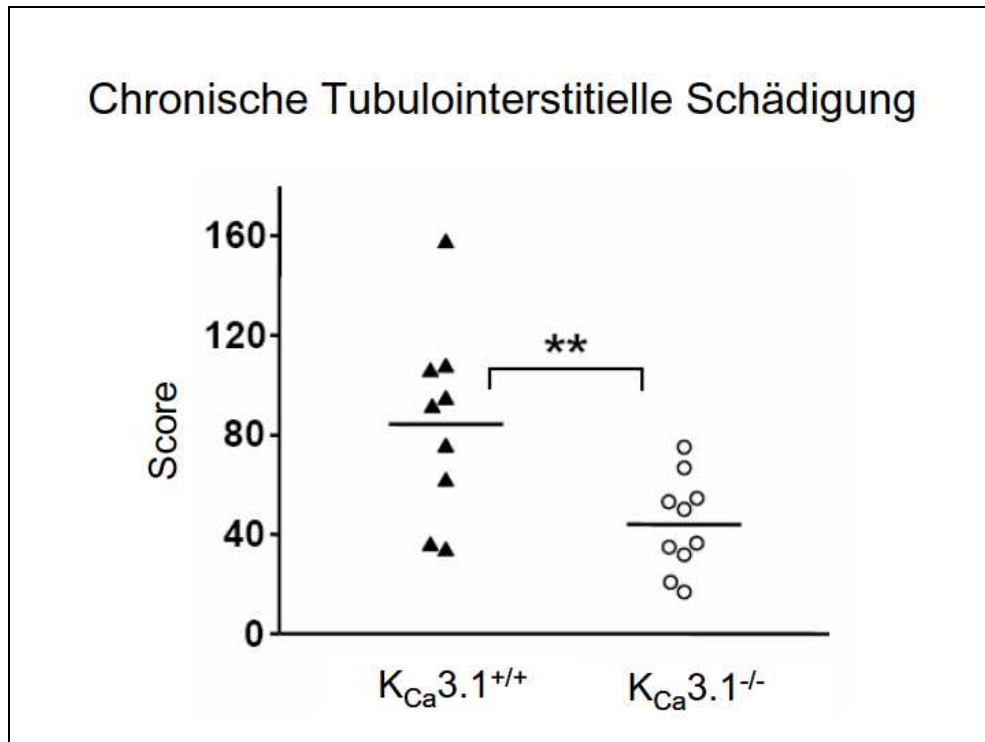


Abbildung 11: Diagramm chronischer tubulointerstitieller Schäden bei Wildtypen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und $K_{Ca3.1}$ -defizienten Mäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$), angegeben in Score-Werten.

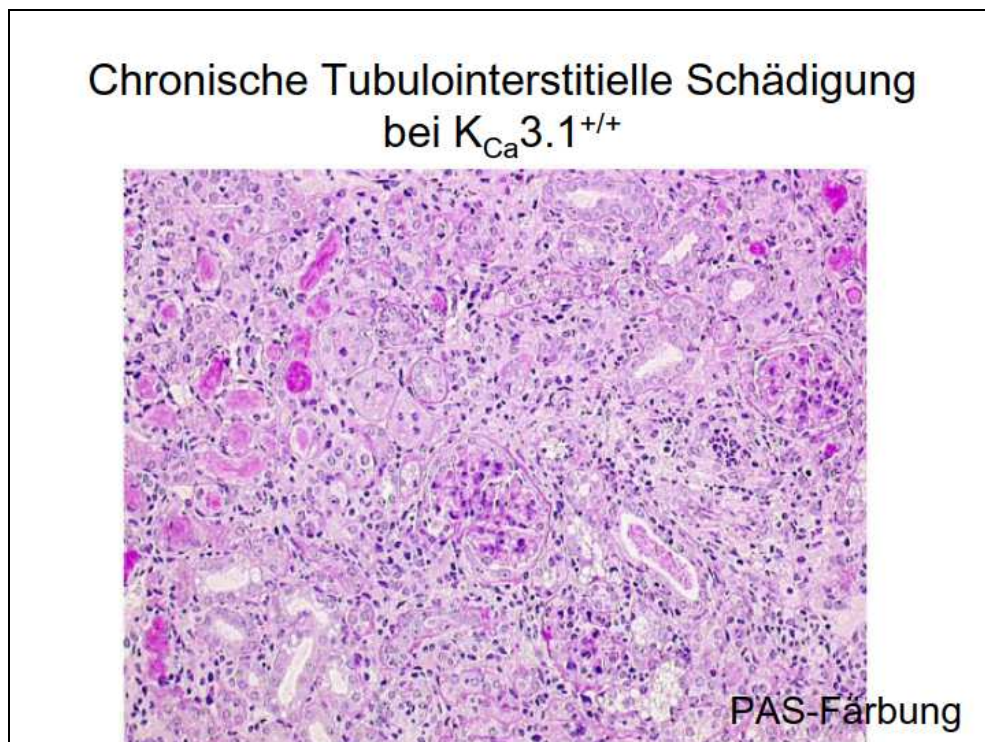


Abbildung 12: Histologische Abbildung chronischer tubulointerstitieller Schäden in Nieren von $K_{Ca3.1}$ -Wildtypen. PAS-Färbung.

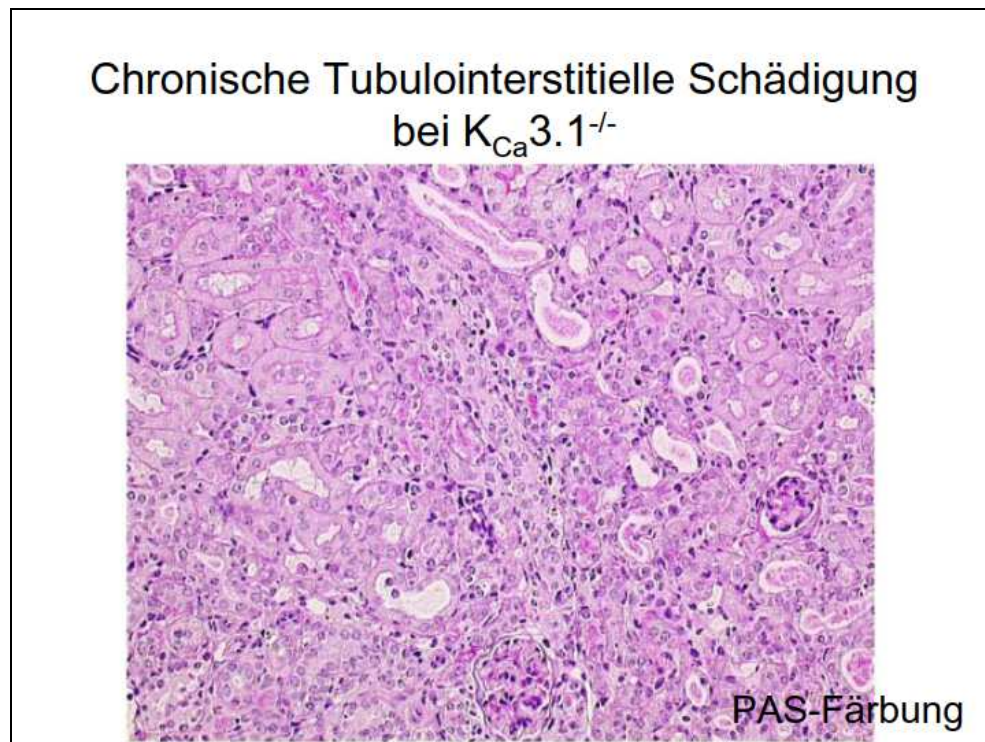


Abbildung 13: Histologische Abbildung chronischer tubulointerstitieller Schäden in $K_{Ca}3.1$ -defizienten Mäusenieren. PAS-Färbung.

3.1.2 Immunhistochemie der Fibrosemarker Kollagen I/III und α SMA

Die durch Immunhistochemie mögliche Anfärbung von interstitiell abgelagertem Kollagen I und III war in $K_{Ca}3.1$ Knock-out-Mäusen deutlich geringer ($\approx -30\%$) als in Wildtypen. Die ermittelten Score-Werte lagen bei $132,5 \pm 6,8$ ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) versus $187,7 \pm 8,9$ ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) ($p = 0,0006$).

Gleiches galt für die Anzahl an Zellen, die eine positive Anfärbbarkeit auf den (Myo)-Fibroblasten-Marker α SMA zeigten. Die ermittelten Zellen pro HPF (High Power Field) lagen bei $18,25 \pm 1,8$ bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ im Vergleich zu $33,1 \pm 4,1$ bei $K_{Ca}3.1^{+/+}$ ($p = 0,008$), gleichbedeutend mit einer Reduktion um rund 45%.

Die immunhistochemisch ermittelten Daten weisen folglich bei defizientem $K_{Ca}3.1$ auf eine signifikante Abnahme an matrixproduzierenden Zellen, den Myofibroblasten, hin, und gleichsam auch auf deren verminderte Aktivität durch geringere Ablagerung kollagenen Stützgewebes.

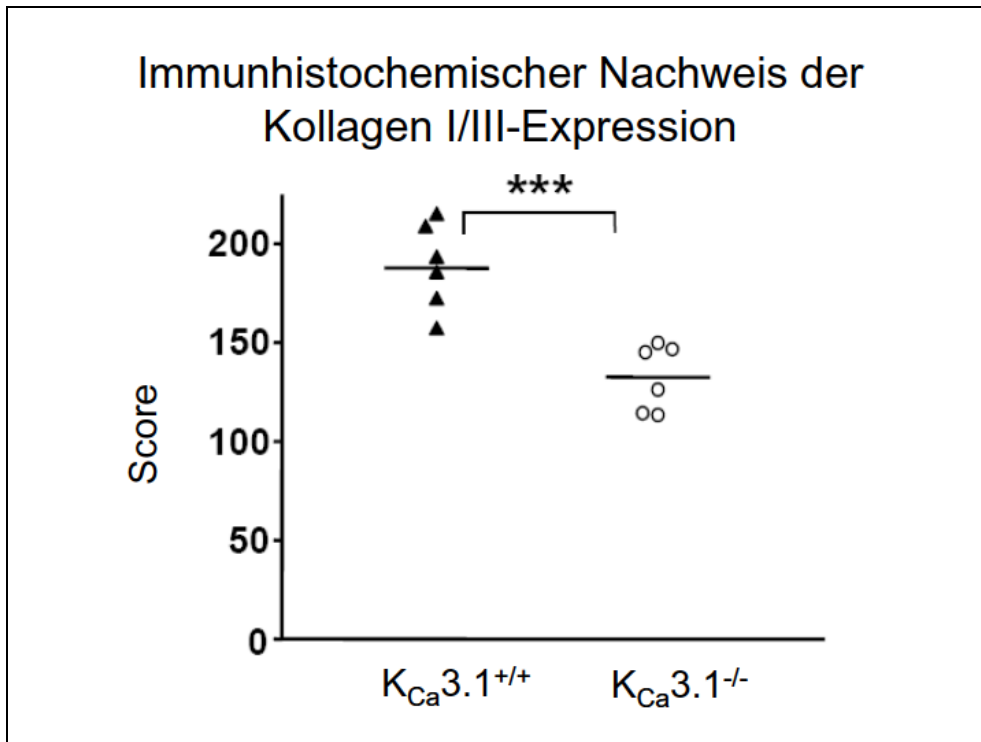


Abbildung 14: Diagramm der immunhistochemisch nachweisbaren Kollagen I- und III-Expression in Nieren von $K_{Ca}3.1$ -Wildtypen und $K_{Ca}3.1$ -Knock-out-Mäusen.



Abbildung 15: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von Kollagen I und III in Nierengewebe von $K_{Ca}3.1$ -Wildtypen.

Immunhistochemischer Nachweis der Kollagen I/III-Expression bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$

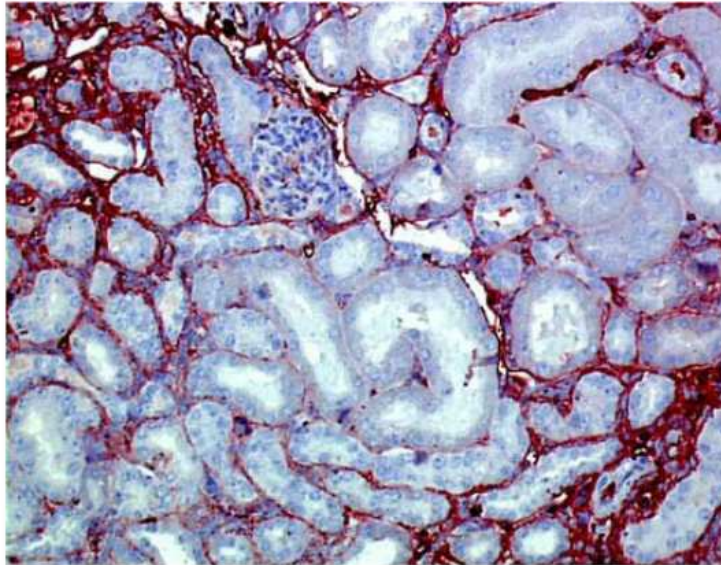


Abbildung 16: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbarkeit von Kollagen I und III in Nierengewebe $K_{Ca}3.1$ -defizienter Mäuse.

Immunhistochemischer Nachweis der α SMA-Expression

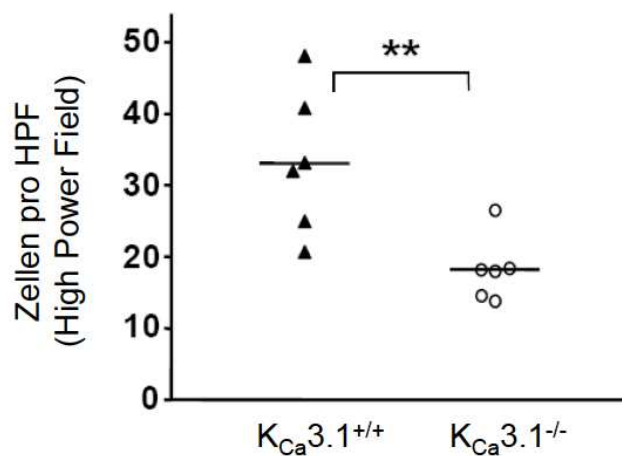


Abbildung 17: Diagramm der immunhistochemisch nachweisbaren α SMA-Expression in Nieren von $K_{Ca}3.1$ -Wildtypen und $K_{Ca}3.1$ -Knock-out-Mäusen.

Immunhistochemischer Nachweis der
 α SMA-Expression bei $K_{Ca}3.1^{+/+}$

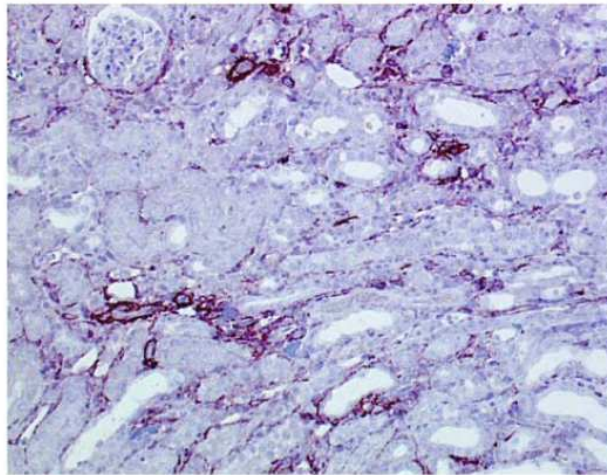


Abbildung 18: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbbbarkeit von α SMA in Mäusenieren von $K_{Ca}3.1$ -Wildtypen.

Immunhistochemischer Nachweis der
 α SMA-Expression bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$

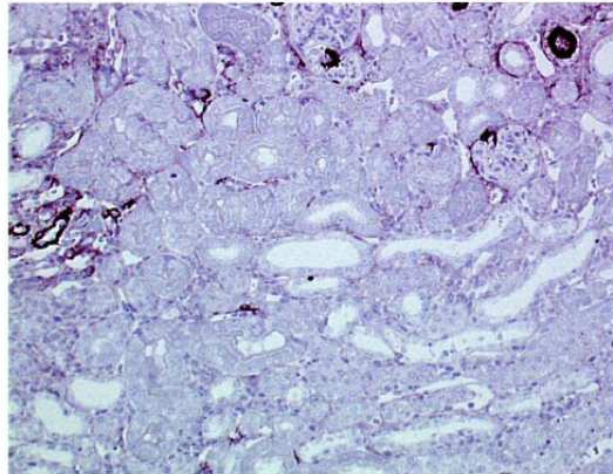


Abbildung 19: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbbbarkeit von α SMA in Nieren von $K_{Ca}3.1$ -Knock-out-Mäusen.

3.1.3 Morphometrische Analysen zu Differenzierungsgrad und Parenchyembreite

Mittels halbautomatischem Bildanalyse-System wurde die Anzahl differenzierter proximaler Tubuli sowie die Breite des Nierenparenchyms untersucht, da es bekannterweise in der letzten Phase der Nierenzerstörung bei Nierenfibrose zu Obliteration der Tubuli, sinkender Anzahl intakter Nephrone und Verschmälerung des Nierenparenchyms kommt (Eddy, 2000). Ursächlich hierfür ist u.a. die Tatsache, dass in fibrotischem Nierengewebe mit zunehmendem Fibrosierungsgrad die Obliteration der Tubuli steigt, ebenfalls einhergehend mit einer zunehmenden Dedifferenzierung dieser Strukturen. Der Differenzierungsgrad proximaler Tubuli eignet sich daher als zusätzlicher Marker für das Fortschreiten des Fibrosierungsprozesses.

Auch die morphometrischen Untersuchungen konnten eine positive Auswirkung auf das Erkrankungsausmaß bei defizientem $K_{Ca3.1}$ bestätigen. So zeigte sich in den UUO-Nieren von Knock-out-Mäusen ein besserer Erhalt der proximalen Nierentubuli ($17,1 \pm 1,2\%$) als im Vergleich zu ihren korrespondierenden Wildtypen ($10,6 \pm 1,0\%$) ($p = 0,00095$).

Die Breite an funktionellem Nierenparenchym 14 Tage nach Ligation war bei Knock-out-Mäusen in höherem Maße erhalten, als dies bei Wildtypen der Fall war ($245,3 \pm 12,7 \mu\text{m}$ (KO) vs. $199,9 \pm 11,8 \mu\text{m}$ (WT)) ($p = 0,02$). Dieser bessere Parenchymerhalt legt nahe, dass bei defizientem $K_{Ca3.1}$ die Vernarbung funktionellen Nierengewebes langsamer voranschreitet und somit eine Progression der durch UUO-induzierten Nierenfibrose signifikant abgeschwächt wird.

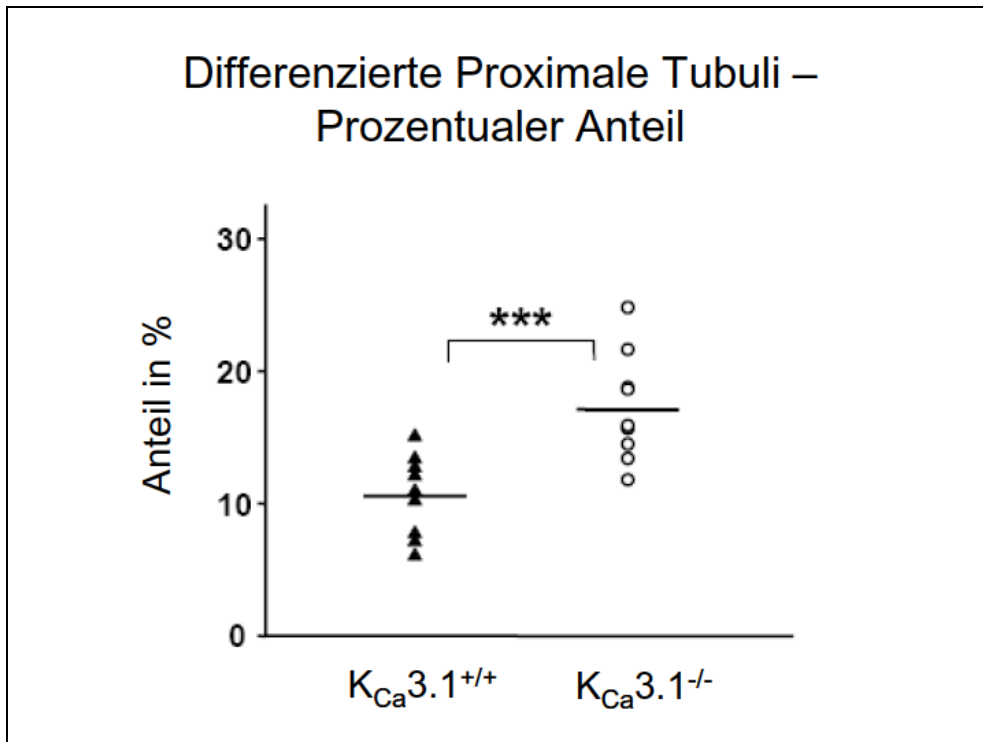


Abbildung 20: Diagramm zur Darstellung des prozentualen Anteils proximaler differenzierter Tubuli in Nieren von $K_{Ca3.1}$ -Wildtypen und $K_{Ca3.1}$ -Knock-out-Mäusen.

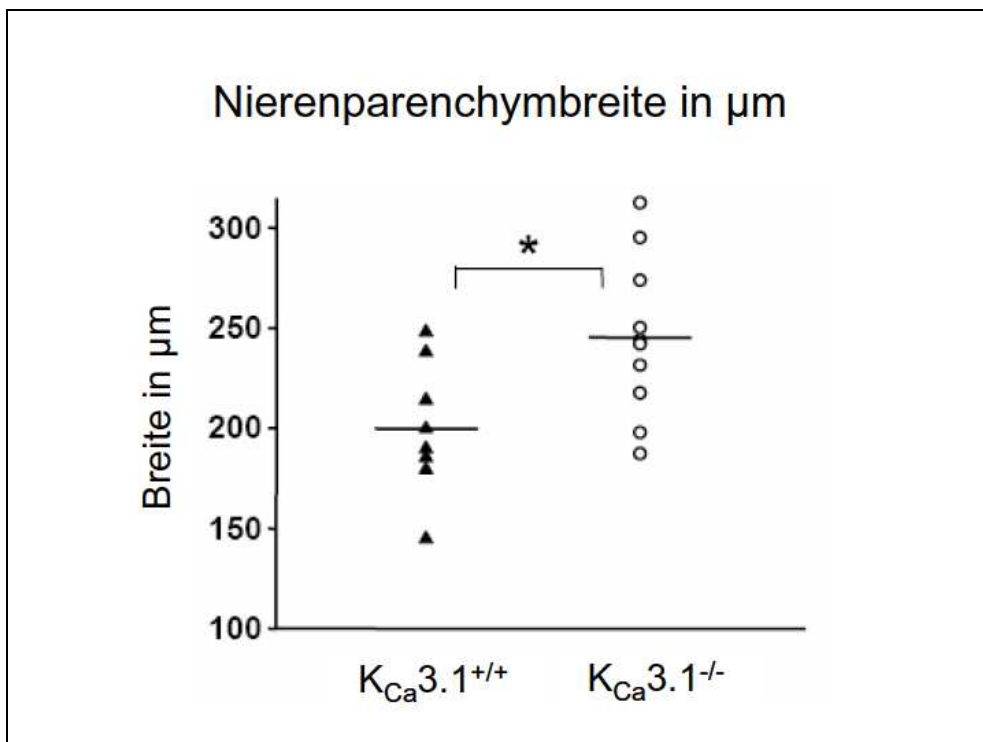


Abbildung 21: Diagramm zum Vergleich der durchschnittlichen Nierenparenchyembreite in μm bei $K_{Ca3.1}$ -Wildtypen und $K_{Ca3.1}$ -Knock-out-Mäusen.

3.2 Histologische Auswertung der Mäusenieren nach Fibroseinduktion bei pharmakologischer Blockade von K_{Ca}3.1

Um zu überprüfen, ob auch durch die spezifische Blockade des K_{Ca}3.1-Kanals die Progression der Nierenfibrose aufgehalten werden kann, wurde eine vergleichende interventionelle Studie wiederum unter Verwendung des UUO-Modells vorgenommen. Hierbei wurden nun gleichgeschlechtliche und altersgleiche Wildtypen einer UUO-Operation unterzogen und entweder in die Behandlungsgruppe (TRAM-34) oder die Kontrollgruppe (Vehikel Erdnussöl) eingeteilt. Das Triarylmethan TRAM-34 wurde eingesetzt aufgrund seiner hochselektiven K_{Ca}3.1-Blockade und seiner guten Toleranz in vivo (Köhler et al., 2003). Den Mäusen wurde ab dem Zeitpunkt der UUO-Operation über den Zeitraum von 3 Wochen eine tägliche intraperitoneale Applikation der entsprechenden Dosis an TRAM-34 oder reinem Vehikel verabreicht.

3.2.1 Pharmakokinetik von TRAM-34

Mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (HPLC/MS) wurden pharmakokinetische Parameter von TRAM-34 im Mäuseplasma nach einmaliger Injektion bestimmt. Dies zeigte eine mittlere Plasmabindungskonzentration des TRAM-34 von ~200 nM 24 Stunden nach einmaliger i.p.-Applikation von 120 mg/kg KG. Gemessen an der IC₅₀ des K_{Ca}3.1 erschien dies als eine absolut ausreichende K_{Ca}3.1-Inhibition in vivo.

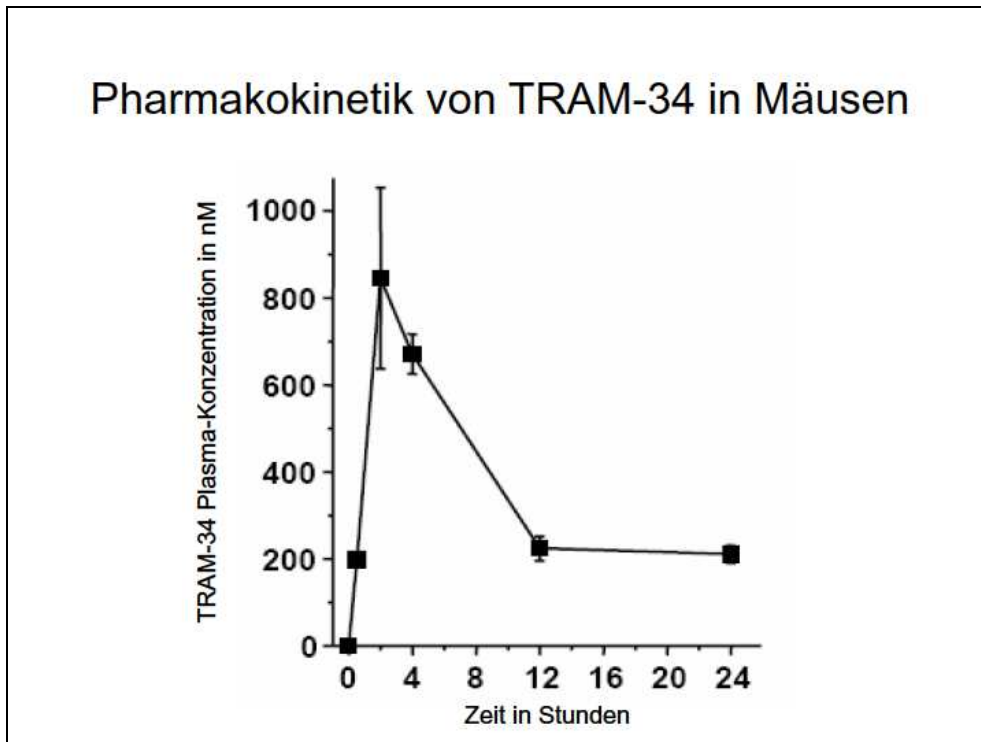


Abbildung 22: Pharmakokinetik der TRAM-34 Plasma-Konzentration in nM in Mäusen, untersucht über eine Zeitspanne von 24 Stunden.

3.2.2 Tubulointerstitielle Schädigung

Ähnlich wie bereits beim Vergleich von Knock-out-Mäusen mit Wildtypen wies insbesondere die PAS-Färbung Unterschiede im Schädigungsgrad der Behandlungs- und Kontrollgruppe auf. Auch hier zeigten sich die Differenzen weniger in der akuten als vielmehr in der chronischen tubulointerstitiellen Schädigung. So ergab die Analyse der Nierenschnitte einen signifikant geringeren Schädigungsgrad ($\approx -38\%$) in der Behandlungsgruppe (Score $78,0 \pm 9,1$) als im Vergleich zur Kontrollgruppe (Score $125,5 \pm 8,6$; $p = 0,004$).

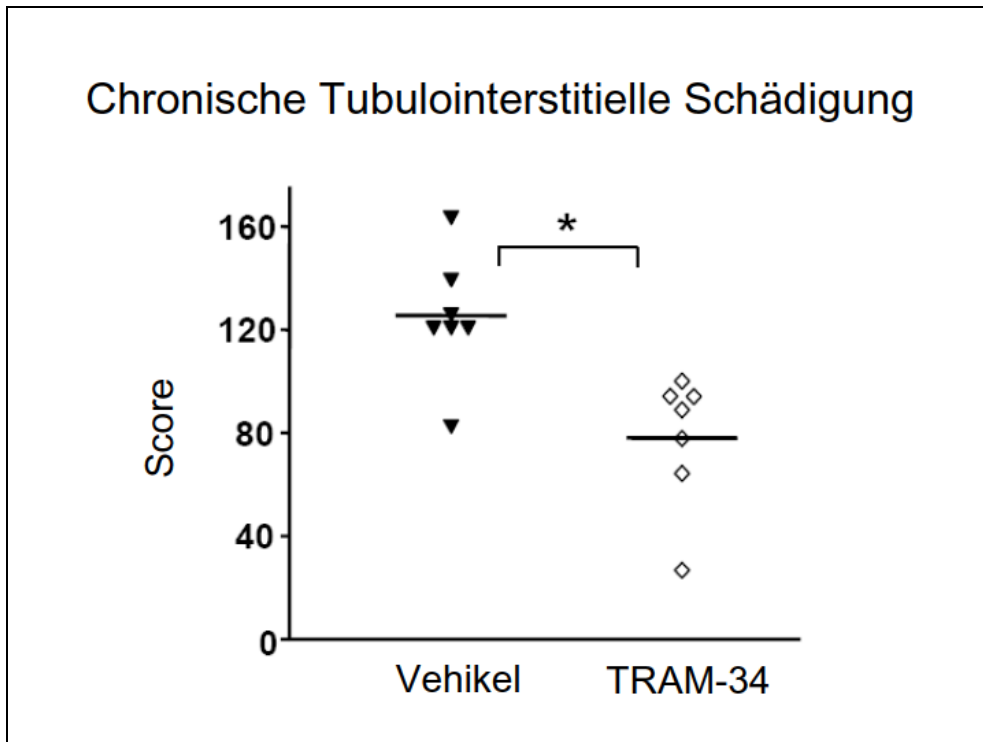


Abbildung 23: Diagramm chronischer tubulointerstitieller Schäden in Mäusenieren, angegeben in Score-Werten, in der Kontrollgruppe nach Behandlung mit dem reinen Vehikel Erdnussöl sowie in der Behandlungsgruppe nach Behandlung mit dem $K_{Ca}3.1$ -Blocker TRAM-34.

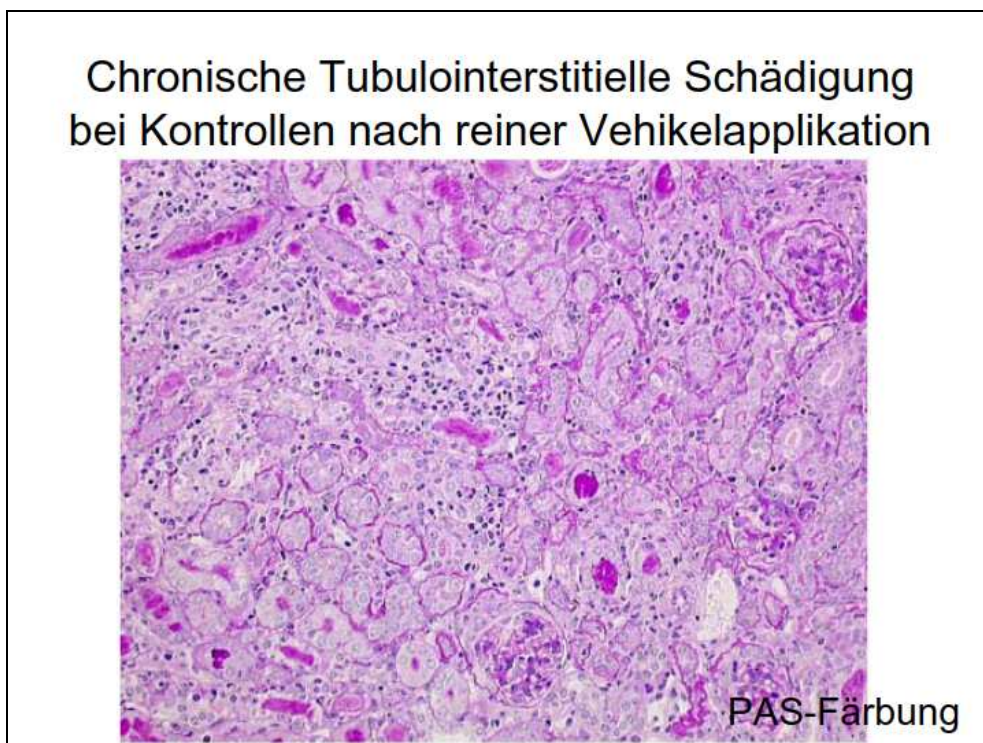


Abbildung 24: Histologische Abbildung chronischer tubulointerstitieller Schäden in Mäusenieren der Kontrollgruppe nach Behandlung mit dem reinen Vehikel. PAS-Färbung.

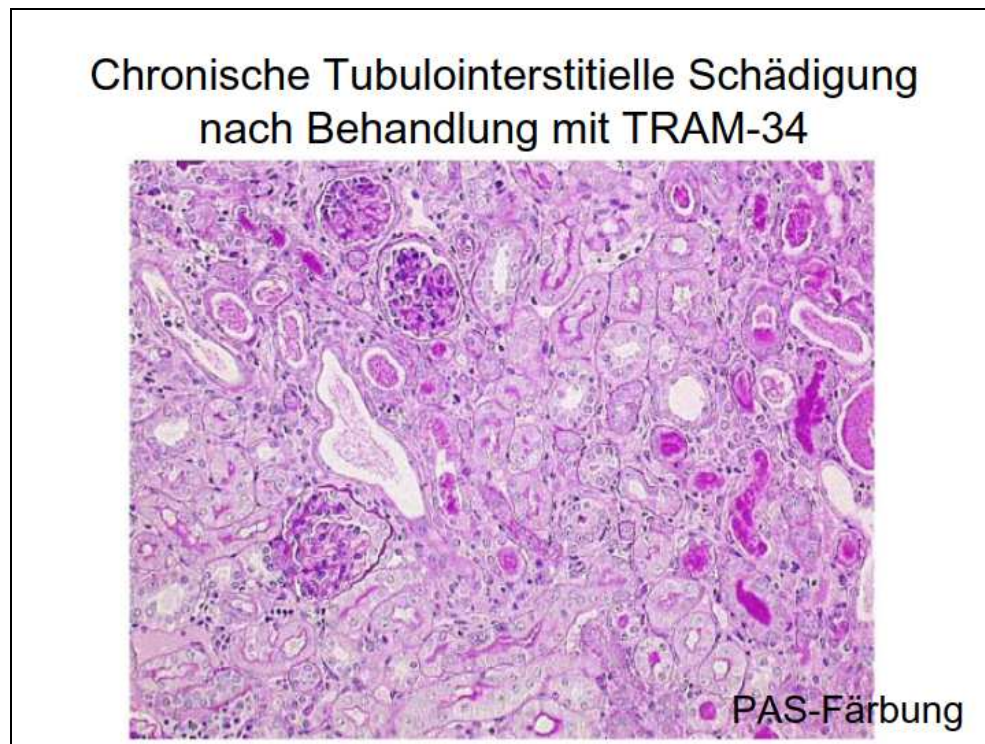


Abbildung 25: Histologische Abbildung chronischer tubulointerstitieller Schäden in Mäusenieren der Behandlungsgruppe nach Behandlung mit TRAM-34. PAS-Färbung.

3.2.3 Immunhistochemie der Fibrosemarker Kollagen I/III und α SMA

Vereinbar mit den bereits genannten Beobachtungen ließ auch die Immunhistochemie eine positive Auswirkung der TRAM-34-Behandlung erkennen.

Die Ablagerung des interstitiellen Kollagens I und III als Fibroseindikator war in der Behandlungsgruppe deutlich geringer ($\approx -27\%$) als dies in der Kontrollgruppe der Fall war (Score $137,6 \pm 5,4$ vs. $189,4 \pm 6,8$) ($p = 0,0006$). Ebenso fanden wir eine signifikante Reduktion ($\approx -49\%$) an α SMA positiven Zellen im interstitiellen Nierengewebe. Hier lagen die ermittelten Zellen pro HPF bei $15,8 \pm 1,5$ vs. $31,1 \pm 1,8$ ($p = 0,0004$).

Die genannten Ergebnisse ließen folglich den Rückschluss auf eine effektive Inhibition des K_{Ca}3.1 und deren positive Auswirkung auf ein zumindest histologisch gesichertes, abgeschwächtes Krankheitsbild zu.

Erwähnt sei an dieser Stelle noch, dass die mit TRAM-34 behandelten Tiere keine offenkundigen Zeichen toxischer Nebenwirkungen im Sinne von außergewöhnlichem Verhalten der Mäuse oder sichtbaren Organveränderungen zeigten.

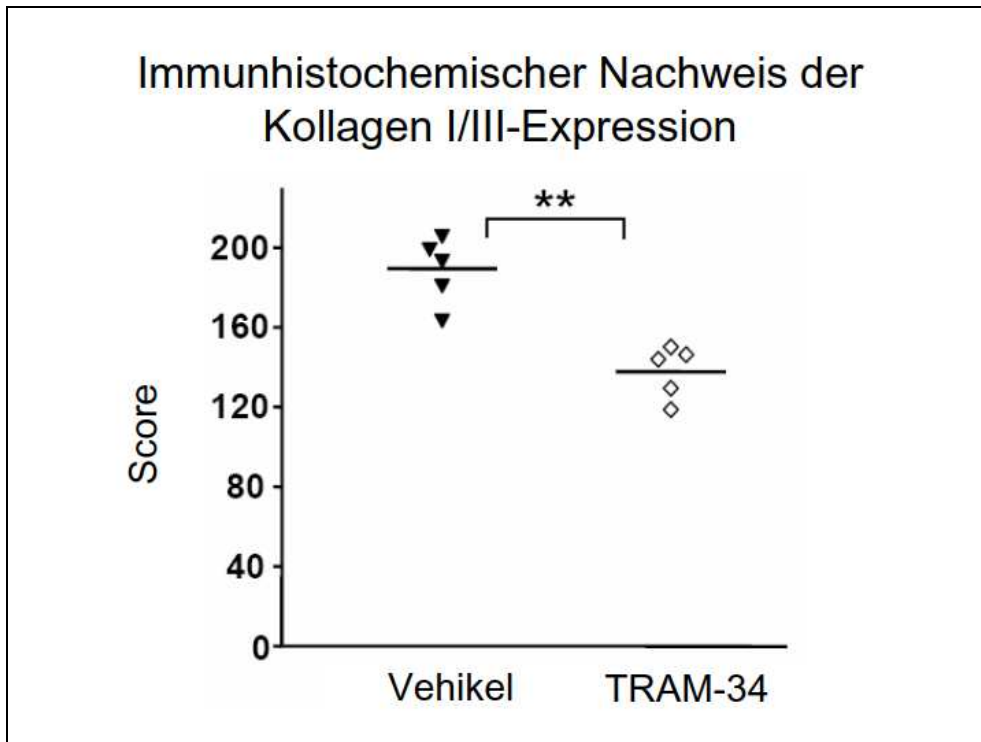


Abbildung 26: Diagramm der immunhistochemisch nachweisbaren Kollagen I- und III-Expression in Mäusenieren in der Kontroll- sowie in der Behandlungsgruppe.



Abbildung 27: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von Kollagen I und III in Mäusenieren der Kontrollgruppe nach Behandlung mit dem reinen Vehikel.

Immunhistochemischer Nachweis der Kollagen I/III-Expression nach Behandlung mit TRAM-34

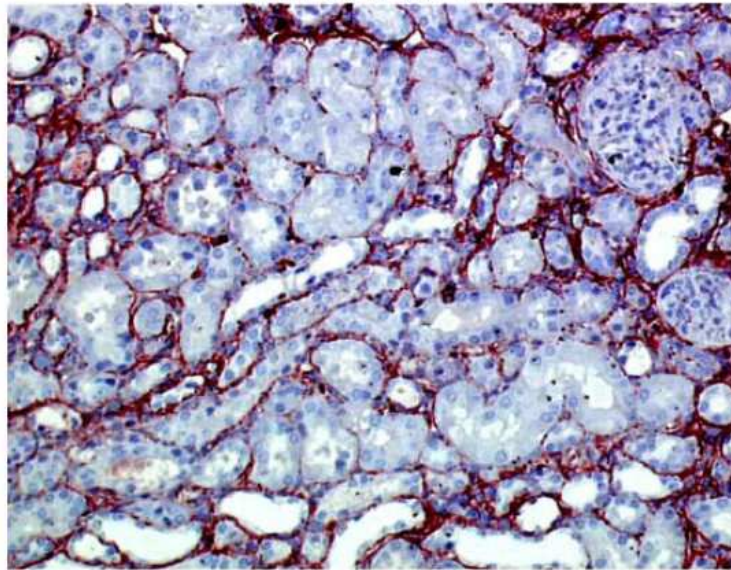


Abbildung 28: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von Kollagen I und III in Mäusenieren der Behandlungsgruppe nach Behandlung mit TRAM-34.

Immunhistochemischer Nachweis der α SMA-Expression

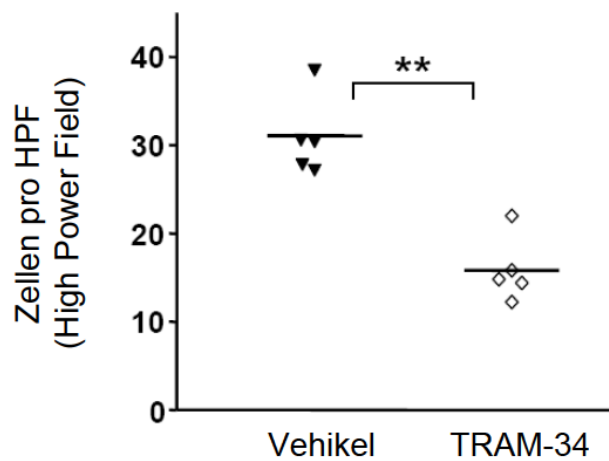


Abbildung 29: Diagramm der immunhistochemisch nachweisbaren α SMA-Expression in Mäusenieren der Behandlungs- sowie der Kontrollgruppe.

Immunhistochemischer Nachweis der
 α SMA-Expression bei Kontrollen nach reiner
Vehikel-Applikation

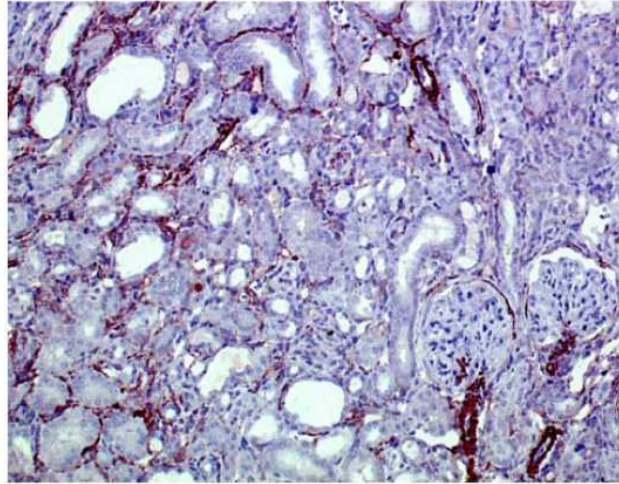


Abbildung 30: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbarkeit von α SMA in Mäusenieren der Kontrollgruppe nach Behandlung mit dem reinen Vehikel.

Immunhistochemischer Nachweis der
 α SMA-Expression nach Behandlung mit
TRAM-34

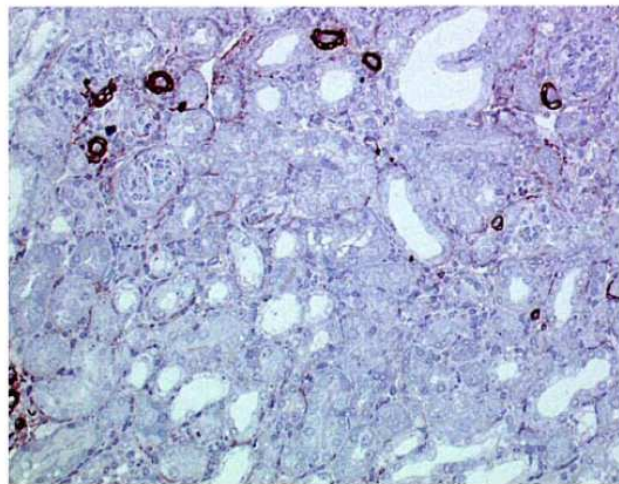


Abbildung 31: Histologische Abbildung der immunhistochemischen Anfärbarkeit von α SMA in Mäusenieren der Behandlungsgruppe nach Behandlung mit TRAM-34.

3.3 Molekularbiologische Analyse des K_{Ca}3.1-Expressionsmusters

Zusätzlich zu den histologischen Auswertungen sollte geprüft werden, ob in fibrosiertem Nierengewebe eine erhöhte Genexpression des K_{Ca}3.1-Kanals vorlag. Diese molekularbiologischen Untersuchungen wurden mittels quantitativer real time-RT-PCR vorgenommen. Als weiteres Untersuchungsziel galt die Expression der verwandten K_{Ca}-Kanäle, K_{Ca}1.1 (BK_{Ca}) und K_{Ca}2.3 (SK_{Ca}) sowie der aus molekularbiologischer Sicht wichtigen Fibrose-Mediatoren oder profibrotischen Faktoren.

3.3.1 Genexpressionsmuster UUO-behandelter Wildtypen im Vergleich zur Kontrolle

Die Untersuchung der Expressionsmuster Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle ergab in UUO-behandelten Wildtypen nach 14-tägiger Behandlung einen mehr als 20-fachen Anstieg der K_{Ca}3.1-Genexpression im Vergleich zum Expressionsmuster scheinoperierter Kontrolltiere. Eine solche Erhöhung der Genexpression konnte hingegen weder bei den verwandten K_{Ca}1.1-Kanälen noch bei K_{Ca}2.3-Kanälen festgestellt werden. Gemäß ungepaartem t-Test lag eine höchstsignifikante Erhöhung der K_{Ca}3.1-Genexpression vor ($p < 0,001$).

In der weiteren Analyse wurden TGFβ1, ein als Fibrose-Initiator geltender Wachstumsfaktor, FSP-1, welches zu Wachstum und Proliferation der Fibroblasten entscheidend beiträgt, sowie die im Stützgewebe unerlässlichen Proteine Kollagen I und III untersucht. Im Ergebnis zeigte sich für alle vier Proteine eine höchstsignifikante Erhöhung der Genexpression bei Tieren mit obstruktiver Nephropathie im Vergleich zur gesunden Kontrolle ($p < 0,001$). Die Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass neben den histologisch bereits konstatierten Auffälligkeiten auch auf der molekularbiologischen Ebene der Genexpression eine Bedeutung des K_{Ca}3.1-Kanals im Zusammenhang mit der Nierenfibrose vorzuliegen scheint.

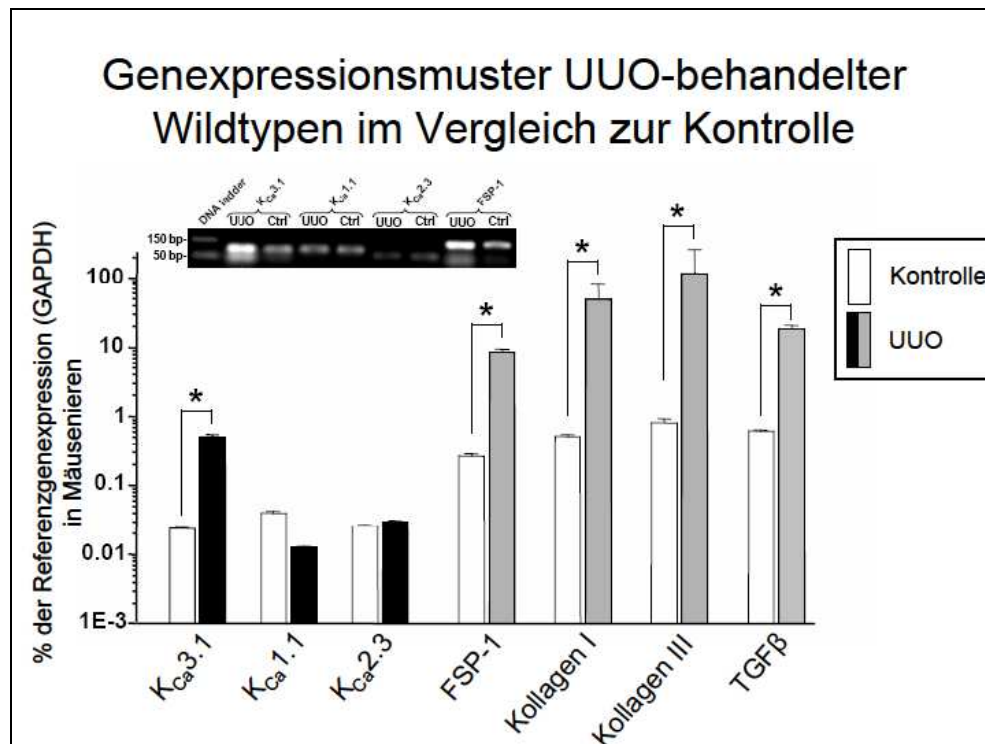


Abbildung 32: Diagramm zum Vergleich der Genexpression ausgewählter Gene (Kalzium-abhängige Kaliumkanäle sowie profibrotische Marker) in Mäusenieren UUO-behandelter Wildtypen und in Kontrolltieren ohne Unilaterale Ureter-Obstruktion.

3.3.2 Genexpressionsmuster UUO-behandelter $K_{Ca3.1}$ Knock-out Mäuse im Vergleich zu Wildtypen

In einer weiteren Untersuchung sollten die genotypisch veränderten Knock-out-Mäuse mit ihren korrespondierenden Wildtypen auf molekularbiologischer Ebene verglichen werden. Auch in dieser Untersuchung unterlagen die Tiere einer 14-tägigen UUO-Behandlung. Neben der Expression der oben bereits erwähnten Fibrosemarker TGFβ1, FSP-1 sowie Kollagen I und III wurde hierbei zusätzlich die Genexpression des in Myofibroblasten hoch exprimierten Proteins αSMA bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass in $K_{Ca3.1}$ -Knock-out-Mäusen eine deutlich niedrigere Expression der so genannten profibrotischen Marker (TGFβ1, FSP-1, Koll. I & III, αSMA) vorlag, als dies bei $K_{Ca3.1}$ -Wildtypen der Fall war.

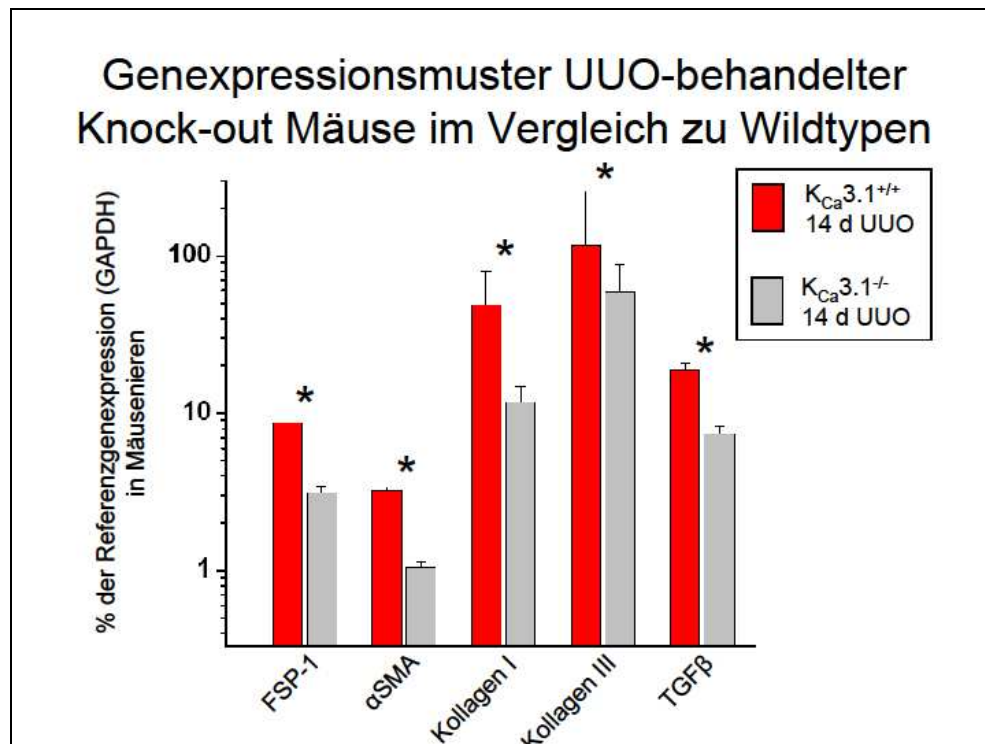


Abbildung 33: Diagramm zur vergleichenden Darstellung der Genexpression profibrotischer Marker in UUO-behandelten Nieren von K_{Ca}3.1-Knock-out-Mäusen und Wildtypen.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider behandelten Gruppen (K_{Ca}3.1^{-/-} und K_{Ca}3.1^{+/+}) zu erzielen, sollten diese miteinander in Verbindung gebracht werden. Hierzu wurden die errechneten Ct-Werte jeweils in Beziehung zur endogenen Kontrolle, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Δ Ct-Wert) und die jeweiligen Δ Ct-Werte beider Gruppen wiederum zueinander in Beziehung gebracht ($\Delta\Delta$ Ct-Wert). Mit den erzielten Ergebnissen ließ sich eine x-fache Zu- bzw. Abnahme definieren.

Das Resultat zeigte eine niedrigere Genexpression von TGFβ1 ($\approx 40\%$), FSP-1 ($\approx 35\%$) und αSMA ($\approx 30\%$) in K_{Ca}3.1-Knock-out-Mäusen im Verhältnis zur Expression in Wildtypen (jeweils 100%). Kollagen I, Hauptprotein des Stützgewebes, zeigte in Knock-out-Mäusen eine rund 25%ige Expression, Kollagen III eine ca. 50%ige verglichen mit den Werten in Wildtyp-Mäusen (jeweils 100%). Alle Daten ließen sich signifikant belegen ($p < 0,05$).

Auch dieser Vergleich bekräftigt die Hypothese einer Bedeutung des K_{Ca}3.1-Kanals im Prozess der Nierenfibrose. Alles in allem scheint ein defizienter

K_{Ca}3.1-Kanal die Progression der Nierenfibrose nach adäquatem Reiz durch UUO abzuschwächen.

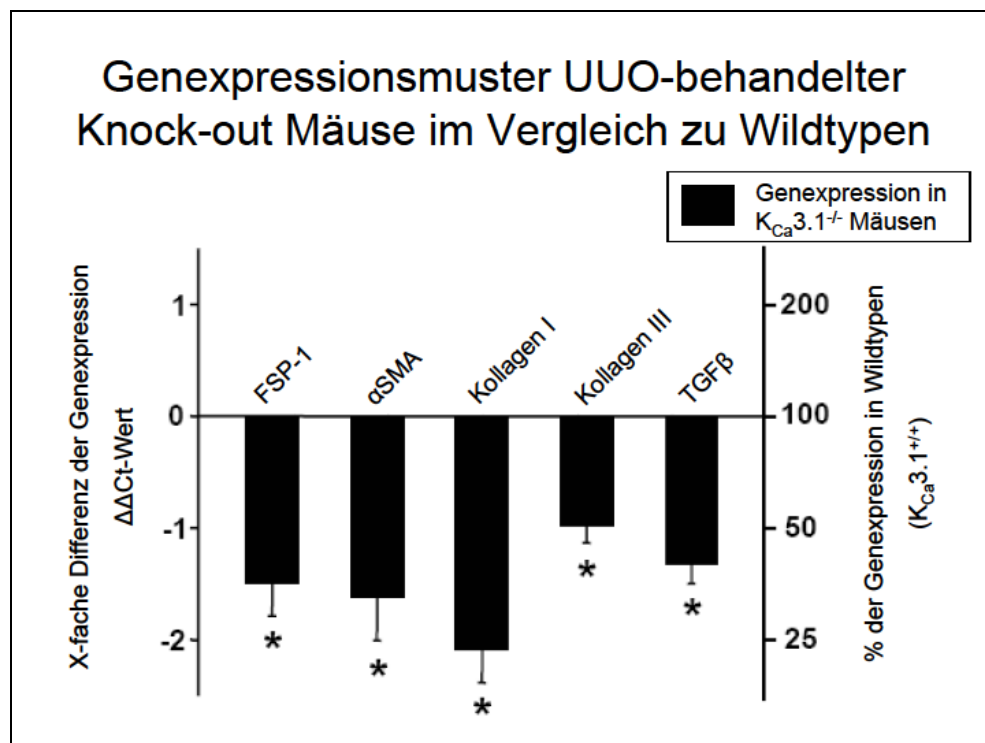


Abbildung 34: Auftragung der Genexpression profibrotischer Marker in UUO-behandelten Nieren von K_{Ca}3.1-Knock-out-Mäusen im Verhältnis zur jeweiligen Expression in Wildtypen (linksseitig ΔΔ-Ct-Wert, rechtsseitig prozentualer Anteil).

3.4 Untersuchung der K_{Ca}3.1-Translation mittels Western Blot

Nachdem nun auf molekularbiologischer Ebene eine verstärkte Expression der mRNA von K_{Ca}3.1 in erkrankten Nieren im Vergleich zu gesunden nachgewiesen wurde, galt es zu beweisen, dass diese vermehrte Information auch tatsächlich in Proteine translatiert wurde. Hierzu führten wir Experimente mittels Western Blot durch, da dieser bekannterweise dem Nachweis von Proteinen dient.

Tatsächlich erhielten wir im Nierengewebe von durch 14 Tage UUO erkrankten Nieren einen beträchtlichen Nachweis für K_{Ca}3.1, wohingegen bei Kontrollen mit scheinoperierten Mäusen die entsprechenden Signale nur sehr schwach ausfielen oder gar nicht feststellbar waren.

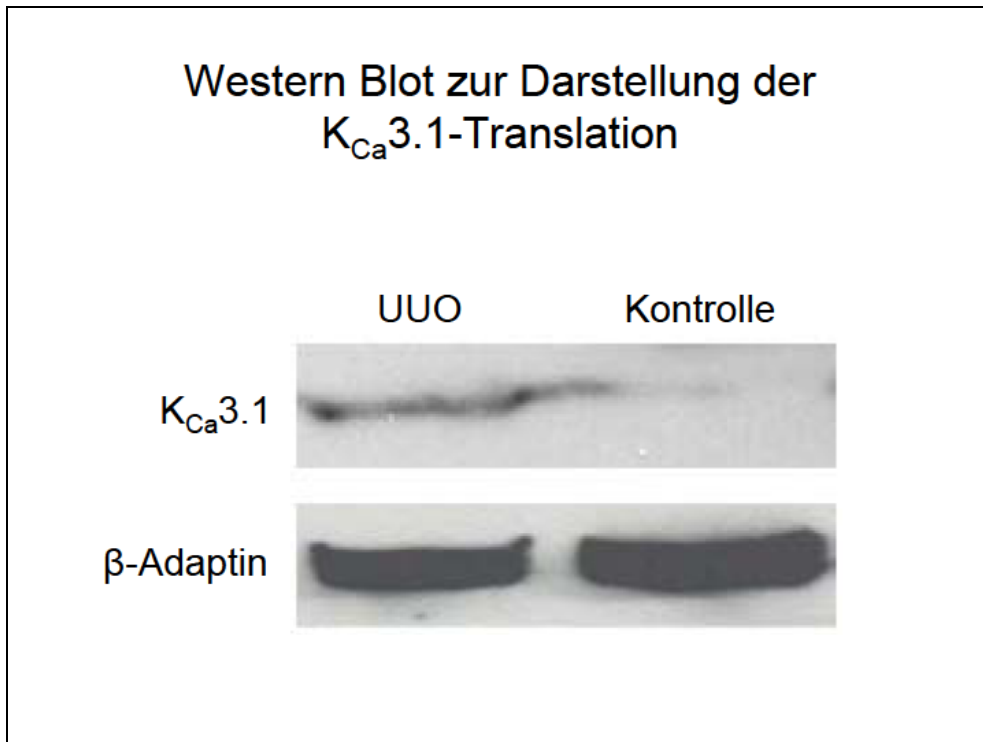


Abbildung 35: Qualitative und quantitative Abbildung der Translation des K_{Ca}3.1-Proteins in Mäusenieren nach UUO-Behandlung sowie in Kontrollnieren mittels Western-Blot. Eine qualitative Aussage kann am Vorhandensein, eine quantitative Aussage anhand der Intensität (Dicke) der Banden getroffen werden. Als endogener Standard wurde β-Adaptin verwendet.

Rückschließend bieten diese Ergebnisse den Beweis für eine fundamentale Bedeutung der K_{Ca}3.1-Hochregulierung in fibrotischem Nierengewebe und deuten auf eine Beteiligung dieses Kanals bei der Pathogenese der renalen Fibrose hin.

4 DISKUSSION

Die exzessive Proliferation aktivierter renaler Fibroblasten ist von entscheidender Bedeutung in der Progression der Nierenfibrose (Neilson, 2006; Wynn, 2007; Zeisberg, Strutz et al., 2001). In der vorliegenden *in vivo* Studie konnte unter Verwendung des Fibrosemodells der UUO bei Mäusen eine Verbindung zwischen dem Fibrosierungsprozess in Mäusenieren auf der einen Seite und Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen auf der anderen Seite hergestellt werden. Die besagte Verbindung beruht auf einer Veränderung des $K_{Ca}3.1$ -Expressionsmusters in UUO-behandelten Mäusen sowie auf einem unterschiedlichen Fibroseausmaß beim Vergleich von Wildtypen mit $K_{Ca}3.1$ -defizienten Mäusen sowie bei Wildtypen nach pharmakologischer Blockade des $K_{Ca}3.1$. Eine suffiziente pharmakologische Blockierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals könnte folglich als potentieller therapeutischer Ansatz dienen.

4.1 Histologische Analyse – Einfluss des $K_{Ca}3.1$ -Kanals auf den Fibrosierungsprozess in Mäusenieren

4.1.1 Untersuchungen im Knock-out-Modell

Um den Einfluss des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in der Entstehung der Nierenfibrose genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Grad der Fibrose nach UUO in $K_{Ca}3.1$ -Knock-out-Mäusen mit jenem in Wildtypen verglichen. Meine Ergebnisse zeigten eine signifikante Abschwächung des Fibrosierungsprozesses nach UUO bei genetisch kodiertem $K_{Ca}3.1$ -Defizit. Dies zeigte sich in einer bedeutenden Reduktion der ECM(Kollagen)-Ablagerung sowie in einer weitaus niedrigeren Anzahl interstitieller Myofibroblasten in UUO-geschädigtem Nierengewebe von Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Diese Ergebnisse wurden unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Färbungen für Kollagen I und III sowie α SMA spezifiziert. In weiteren, auch morphometrischen histologischen Untersuchungen zeigte sich, dass zwar nicht der akute, jedoch der subchronische und chronische tubulointerstitielle Schaden bei

Knock-out-Mäusen signifikant schwächer als bei Wildtypen ausfiel, und auch das Nierenparenchym blieb bei geringerem Fibroseausmaß besser intakt gemessen an der Parenchymbreite sowie an der Anzahl intakter Tubuli.

Wie bereits in Studien belegt, bewirkt vornehmlich die interstitielle Fibrose den eigentlichen Nierenschaden. Hierbei führt die ECM-Ablagerung zu Kompression der Tubuli sowie der peritubulären Kapillaren, was in einer Ischämie tubulointerstitieller Bereiche mit Dysfunktion aufgrund von Obliteration und folglich Untergang funktionellen Gewebes mündet (Eddy, 2000; Sadlier et al., 2004; Eddy, 2005; Harris & Neilson, 2006). Auch andere Studien setzen den Zeitpunkt der Matrixexpansion quasi als ‚point of no return‘ im Krankheitsgeschehen (Kriz et al., 2003; Kriz, 2003; Kriz & Le Hir, 2005).

Meine Ergebnisse deuten rückschließend darauf hin, dass der Verlust des $K_{Ca3.1}$ -Kanals die Proliferation renaler (Myo)-Fibroblasten während eines Fibrosierungsprozesses und folglich auch die Matrixsynthese reduzieren kann.

4.1.2 Pharmakotherapeutische Suppression der Nierenfibrose durch einen $K_{Ca3.1}$ -Blocker

Um einen möglichen pharmakologischen Ansatzpunkt zur Fibrosereduktion zu erhalten, untersuchten wir zusätzlich in einer vergleichenden experimentellen Behandlungsstudie Wildtypen, die mit dem hochspezifischen und effizienten $K_{Ca3.1}$ -Blocker TRAM-34 (Wulff et al., 2000; Wulff et al., 2001) behandelt wurden. Als Kontrollgruppe dienten Wildtypen, die hingegen eine tägliche Applikation der Trägersubstanz Erdnussöl erhielten.

Zunächst stellten wir mittels gekoppelter HPLC und Massenspektrometrie fest, dass durch die tägliche Applikation des TRAM-34 in einer Konzentration von 120 mg/kg KG ein ausreichend hoher Plasmaspiegel erzielt wurde. Dies sahen wir gewährleistet durch einen TRAM-34-Plasmaspiegel, der nach 24 Stunden im Mittel bei 200 nM lag und somit ausreichend war für eine Kanalblockade (IC_{50} 20 nM).

Diese pharmakologische Interventionsstudie ergab einen gleichermaßen protektiven Effekt, wie er bereits im Knock-out-Modell beobachtet wurde,

im Sinne einer effektiv reduzierten Entwicklung tubulointerstieller Schäden. Darüber hinaus ließ sich durch pharmakologische Blockade des $K_{Ca}3.1$ die Anzahl aktiver Myofibroblasten und das Ausmaß fibrotisch vernarbten Gewebes in erkrankten Nieren beträchtlich reduzieren, was wiederum in immunhistochemischen Färbungen validiert wurde. Demnach scheint neben einem genetisch kodierten Verlust des Kanals auch eine pharmakologische Inhibition die Nierenfibrose in diesem Tiermodell effektiv abzumildern. Meine Befunde stehen auch in gutem Einklang mit anderen Untersuchungen zur Bedeutung von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen bei pathologischen Zellproliferationsprozessen in verschiedenen Geweben. Hier konnte ebenfalls in tierexperimentellen Studien zur akuten Gefäßschädigung nach Endothelenudation und nachfolgender Neointimabildung in Ratten und Schweinen (Köhler et al., 2003; Tharp et al., 2008), zur Atherosklerose in ApoE-defizienten Mäusen (Toyama et al., 2008), zur *in vivo* Angiogenese im murinen „Matrigel-Plug Assay“ (Grgic et al., 2005) und zum experimentellen Endometriumkarzinom in der Maus (Wang et al., 2007) eine selektive Blockade des $K_{Ca}3.1$ die Zellproliferationsprozesse *in vivo* wirkungsvoll hemmen und damit den pathologischen Prozess abmildern. Ein aus toxikologischer Sicht wichtiger Befund ist auch, dass die Langzeitbehandlung mit TRAM-34 per se keine offenkundigen Gewebeschädigungen hervorruft (Köhler et al., 2003; Toyama et al., 2008) und damit gut verträglich erscheint. Auch in der vorliegenden Studie konnten keine offensichtlichen Organschädigungen beobachtet werden. In einer detaillierten Nekropsie nach Langzeitbehandlung mit TRAM-34 konnte ebenfalls eine gute Verträglichkeit nachgewiesen werden (Toyama et al., 2008). Insgesamt erscheint es daher möglich, dass eine spezifische Blockade des $K_{Ca}3.1$ mit TRAM-34 ein neuartiger pharmakotherapeutischer Angriffspunkt zur Behandlung der Nierenfibrose und auch anderer fibroproliferativer Prozesse sein könnte.

4.2 Molekularbiologische Analyse

4.2.1 Korrelation von $K_{Ca}3.1$ -Expression und Fibroseausmaß

Da histomorphologische Untersuchungen keinen Aufschluss über die Mechanismen der Hochregulation profibrotischer Faktoren machen können, wurde das Nierengewebe auch auf molekularbiologischer Ebene hinsichtlich der mRNA-Expressionsveränderungen analysiert. Diese Untersuchungen sollten zunächst ergeben, ob die UUO-Schädigung und konsekutive Nierenfibrose mit einer Induktion des Kanals assoziiert ist.

Der Vergleich des Genexpressionsmusters behandelter Wildtypen mit dem Expressionsmuster scheinoperierter Kontrolltiere zeigte eine gut 20-fach höhere mRNA-Expression für $K_{Ca}3.1$ in den UUO-geschädigten Nieren im Vergleich zu gesunden Nieren. Diese Befunde der mRNA-Expressionsanalysen wurden auch mittels Western-Blot-Analysen zur Untersuchung der $K_{Ca}3.1$ -Proteinmenge bestätigt, denn in den fibrotischen Nieren konnte ein deutlich erhöhter Proteinspiegel des Kanals festgestellt werden.

Eine Hochregulation, wie wir sie für den $K_{Ca}3.1$ -Kanal sahen, zeigte sich weder bei dem verwandten $K_{Ca}1.1$ (BK)-Kanal noch bei dem verwandten $K_{Ca}2.3$ (SK)-Kanal, wodurch dem $K_{Ca}3.1$ eine spezifische Funktion im Vergleich zu weiteren K_{Ca} -Kanälen bei der Nierenfibrose zukommt.

4.2.2 $K_{Ca}3.1$ -Expression in Korrelation zu profibrotischen Faktoren

In der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren festgestellt werden, dass begleitend zur erhöhten $K_{Ca}3.1$ -Expression in fibrotischem Nierengewebe auch die Expression der (Myo)-Fibroblastenmarker α SMA sowie FSP-1 gesteigert war. Ebenso fand ich eine erhöhte Kollagen-Expression sowie eine deutlich gesteigerte TGF β 1-Expression.

Bei $K_{Ca}3.1$ -defizienten Tieren lag das mRNA-Expressionsniveau für FSP-1 bei 35% des Niveaus in Wildtypen, die Expression des α SMA bei 30%. Des Weiteren war in Knock-out-Mäusen eine um 50% geringere mRNA-Expression des Kollagen III und eine um 25% geringere des Kollagen I festzustellen, was insgesamt für eine deutlich geringere Bindegewebsbildung (Gesamtkollagen) spricht.

Es ist gut belegt, dass TGF β 1 als mitogener Faktor eine bedeutende Rolle bei der Initiation der Nierenfibrose spielt (Eddy, 1996; Tian & Phillips, 2003; Hou et al., 2005; Yang et al., 2003; Fukasawa et al., 2004). Bezüglich der Expression des TGF β 1 ergab die vorliegende Untersuchung, dass in K_{Ca}3.1-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen eine um 60% reduzierte TGF β 1-mRNA-Expression in den fibrotischen Nieren detektiert wurde. Hier kann nun spekuliert werden, inwieweit das Fehlen des Kanals zu einer Verminderung der TGF β 1-mRNA-Expression und damit zu einer Verminderung der Fibroblastenaktivierung und -proliferation führen könnte.

Insgesamt zeigt die Arbeit nun, dass der Verlust von K_{Ca}3.1 mit einer verminderten Expression profibrotischer Faktoren und fibroseinduzierender Produkte assoziiert ist. Inwieweit hier eine direkte Beeinflussung von durch K_{Ca}3.1-Verlust bedingter verminderter TGF β 1-mRNA-Expression besteht oder andere Mechanismen zum insgesamt geringeren Fibrosegrad führen kann auf Grundlage der vorliegenden Befunde jedoch nicht geklärt werden.

4.3 Funktionelle Bedeutung der K_{Ca}3.1-Expression in der Nierenfibrose

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Verbindung zwischen Ausmaß der Nierenfibrose und Expression Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanäle, im Speziellen dem K_{Ca}3.1, hergestellt werden. Mit Hilfe des UUO-Modells zeigte sich, dass bei fehlendem K_{Ca}3.1-Kanal das Ausmaß der Nierenfibrose samt Anzahl aktivierter Fibroblasten reduziert war sowie die mRNA-Expression wichtiger profibrotischer Faktoren einem weniger starken Anstieg unterlag als im Vergleich zu Wildtypen.

Es sollte abschließend notiert werden, dass aktivierte residente Fibroblasten nicht die einzigen beteiligten Zellen in der Matrixproduktion sind. Anderen Studien zufolge spielen auch transdifferenzierte Tubulusepithelzellen sowie Endothelzellen im Prozess der EMT (Iwano et al., 2002; Yamashita et al., 2005) und EndMT (Zeisberg et al., 2008) eine Rolle in der Rekrutierung von Myofibroblasten. Auch die Infiltration durch Zellen des Knochenmarks (Li et al., 2007; Iwano et al., 2002) und periadventitielle Zellen (Faulkner et

al., 2005; Wiggins et al., 1993) wurden als ursächlich für Nierenfibrose von verschiedenen Arbeitsgruppen erachtet.

Inwieweit hier bei defizientem $K_{Ca3.1}$ die genannten unterschiedlichen Pathomechanismen beeinträchtigt werden kann nicht beantwortet werden und war auch nicht primäres Ziel dieser Studie, die darauf abzielte festzustellen, ob durch eine pharmakologische oder genetische Suppression des $K_{Ca3.1}$, als Zellproliferation- und Migration-steuernder Kanal, der Prozess der Nierenfibrose aufgehalten werden kann. Insgesamt stützen die Befunde meiner Untersuchung diese Annahme und somit kann abschließend spekuliert werden, ob eine pharmakologische Inhibition des $K_{Ca3.1}$ eine neuartige Therapiestrategie zur Prävention der Nierenfibrose und terminaler Niereninsuffizienz sein könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nierenfibrose ist ein viel gefürchtetes Endresultat chronischen Nierenversagens, das durch die steigende Notwendigkeit der Anwendung eines Nierenersatzverfahrens ein erhebliches klinisches und volkswirtschaftliches Problem darstellt.

Die Ätiologie der Nierenfibrose ist dabei sehr vielfältig, ursächlich in der Pathogenese scheint jedoch eine geänderte Funktion und Morphe der Fibroblasten zu sein, die durch den Erhalt kontraktile Fasern und vermehrter Sekretionsfähigkeit perivaskuläre und tubulointerstitielle entzündliche Bereiche der Niere besiedeln mit dem Versuch, entstandenen Schaden zu reparieren. Durch übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix kommt es dabei jedoch zu Kompression und Atrophie gesunden Gewebes mit der Fibrose als morphologisches Korrelat.

Der intermediäre Kalzium-abhängige Kaliumkanal $K_{Ca3.1}$ scheint über eine Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Migration verschiedener Zellen, so auch der Fibroblasten, zu spielen. In der vorliegenden *in vivo*-Arbeit wurde daher unter Zuhilfenahme von $K_{Ca3.1}$ -defizienten Mäusen im UUO-Modell der Maus mittels histologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Methodik (RT-PCR, Western Blot) untersucht, ob eine veränderte Expression des $K_{Ca3.1}$ am Prozess der Nierenfibrose beteiligt sein könnte.

Sowohl die histologischen als auch die molekularbiologischen Untersuchungen unterstützten die Hypothese von der Bedeutung der $K_{Ca3.1}$ -Expression im Fibrosierungsprozess. Während $K_{Ca3.1}$ -Wildtypen bei starker Fibrose eine deutlich hochregulierte Expression der $K_{Ca3.1}$ -mRNA sowie weiterer profibrotischer Marker im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen, zeigten $K_{Ca3.1}$ -Knock-out-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen bei gleichem Entzündungsreiz eine weitaus mildere Fibrose mit geringerem Anstieg profibrotischer Marker. Eine ähnlich effektive Milderung der renalen Fibrose konnte auch durch pharmakologische Blockade des Kanals in

Wildtypen mit Hilfe des hochspezifischen $K_{Ca}3.1$ -Inhibitors TRAM-34 erreicht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine Sonderstellung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals im Fibrosierungsprozess der Niere hin. Die durch seine Induktion hervorgerufene intrazelluläre Kalzium-Signalgebung scheint ein wichtiger Mediator für Proliferation, Migration und verstärkte ECM-Sekretion in Fibroblasten zu sein. Eine effiziente pharmakologische Blockade des Kanals könnte einen wichtigen therapeutischen Ansatz für die Zukunft bieten und durch Prävention oder Verzögerung des terminalen Nierenversagens Patienten vor einem frühzeitigen Nierenersatzverfahren bewahren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Anwer K**, Oberti C, Perez GJ, Perez-Reyes N, McDougall JK, Monga M, Sanborn BM, Stefani E, Toro L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol.* 265:C976-85, 1993.
2. **Barrière H**, Tauc M, Poujeol P. Use of knock-out mouse models for the study of renal ion channels. *J Membr Biol.* 198:113-124, 2004.
3. **Bascands JL**, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* 68:925-937, 2005.
4. **Berridge MJ**, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21, 2000.
5. **Blatz AL**, Magleby KL. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature.* 323:718-20, 1986.
6. **Blatz AL**, Magleby KL. Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci.* 10:463-467, 1987.
7. **Borisova L**, Shmygol A, Wray S, Burdyga T. Evidence that a Ca²⁺ sparks/STOCs coupling mechanism is responsible for the inhibitory effect of caffeine on electro-mechanical coupling in guinea pig ureteric smooth muscle. *Cell Calcium.* 42:303-11, 2007.
8. **Brenner R**, Perez GJ, Bonev AD. Vasoregulation by the beta1 subunit of a calcium-activated potassium channel. *Nature.* 407:870-876, 2000.

9. **Candia S**, Garcia ML, Latorre R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance $\text{Ca}(2+)\text{-activated K}^+$ channel. *Biophys J*. 63:583-90, 1992.
10. **Chang HY**, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:12877-82, 2002.
11. **Cheong A**, Bingham AJ, Li J, Kumar B, Sukumar P, Munsch C, Buckley NJ, Neylon CB, Porter KE, Beech DJ, Wood IC. Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation. *Mol Cell*. 20:45-52, 2005.
12. **Classen M**, Diehl V, Kochsiek K. Innere Medizin. *Urban & Fischer*. 5. Auflage, 2004.
13. **Daut J**, Standen NB, Nelson MT. The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 5:154-181, 1994.
14. **Devor DC**, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. Modulation of Cl^- secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a $\text{Ca}(2+)\text{-dependent K}^+$ channel. *Am J Physiol*. 271:L775-784, 1996.
15. **Devor DC**, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and chloride secretion in calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol*. 113:743-760, 1999.
16. **Dudley DT**, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A Synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:7686-9, 1995.

17. **Eddy AA.** Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 7:2495-2508, 1996.
18. **Eddy AA.** Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol.* 15:290-301, 2000.
19. **Eddy AA.** Can renal fibrosis be reversed? *Pediatr Nephrol.* 20:1369-1375, 2005.
20. **Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, el Nahas AM.** Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 12:43-50, 1995.
21. **Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J.** Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance Kca channel, IKCa1. *J Biol Chem.* 274:5746-5754, 1999.
22. **Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Joaquin CR, Ganellin CR, Chandy KG, Cahalan MD.** Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 276:12249-12256, 2001.
23. **Faulkner JL, Szykalski LM, Springer F, Barnes JL.** Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II-induced renal fibrosis. *Am J Pathol.* 167:1193-1205, 2005.
24. **Frei U, Schober-Halstenberg HJ.** Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006. Jahresvergleiche 1995-2005. *QuaSi Niere* 2006.

25. **Fukasawa H**, Yamamoto T, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Suzuki S, Kitagawa M, Hishida A. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:8687-8692, 2004.
26. **Galvez A**, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*. 265:11083-90, 1990.
27. **Gauthier KM**, Spitzbarth N, Edwards EM, Campbell WB. Apamin-sensitive K⁺ currents mediate arachidonic acid-induced relaxations of rabbit aorta. *Hypertension*. 43:413-419, 2004.
28. **Ghanshani S**, Wulff H, Miller LJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*. 275:37137-37149, 2000.
29. **Giangiacomo KM**, Garcia ML, McManus OB. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry*. 31:6719-27, 1992.
30. **Goumans MJ**, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovasc Med*. 18:293-298, 2008.

31. **Grande MT**, López-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 5:319-28, 2009.
32. **Greenburg G**, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 95:333-339, 1982.
33. **Grgic I**, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, Köhler R. Selective blockade of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:704-709, 2005.
34. **Grgic I**, Wulff H, Eichler I, Flothmann C, Köhler R, Hoyer J. Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection. *Transplant Proc.* 41:2601-6, 2009.
35. **Gribkoff VK**, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett JE Jr, Kozlowski ES, Romine JL, Trojnacki JT, McKay MC, Zhong J, Dworetzky SI. Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol Pharmacol.* 50:206-217, 1996.
36. **Grimm PC**, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, Stern E, Rush DN. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med.* 345:93-97, 2001.
37. **Grimm PR**, Sansom SC. BK channels in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 16:430-436, 2007.

38. **Groschner K**, Graier WF, Kukovetz WR. Activation of a small-conductance $\text{Ca}(2+)\text{-dependent K}^+$ channel contributes to bradykinin-induced stimulation of nitric oxide synthesis in pig aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Acta*. 1137:162-70, 1992.
39. **Gutman GA**, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias, Desir M, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti B, Seino S, Stuehmer W, Tamkun M, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS. International union of pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*. 55:583-586, 2003.
40. **Hansen RS**, Grunnet M, Olesen SP, Jensen BS. The effect of DCEBIO on SK channels. *Am J Physiol*. 275:C848-856, 2001.
41. **Harris RC**, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med*. 57:365-80, 2006.
42. **Haufe CC**, Eismann U, Deppisch RM, Stein G. Expression of beta2-microglobulin and c-fos mRNA: is there an influence of high- or low-flux dialyzer membranes? *Kidney Int Suppl*. 78:S177-81, 2001.
43. **Hay ED**, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis*. 26:678-90, 1995.
44. **Hebert SC**, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev*. 85:319-371, 2005.

45. **Hörl WH**, Wanner C. Dialyseverfahren in Klinik und Praxis. Nebel M. Kosten der Nierenersatztherapie. *Thieme Verlag*. 6. Auflage: 619, 2003.
46. **Hosseini R**, Benton DC, Dunn PM, Jenkinson DH, Moss GW. SK3 is an important component of K(+) channels mediating the afterhyperpolarization in cultured rat SCG neurones. *J Physiol*. 535:323-34, 2001.
47. **Hou CC**, Wang W, Huang XR, Fu P, Chen TH, Sheikh-Hamad D, Lan HY. Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks transforming growth factor- β signaling and fibrosis in rat remnant kidney. *Am J Pathol*. 166:761-771, 2005.
48. **Hoyer J**, Distler A, Haase W, Gögelein H. Ca²⁺ influx through stretch-activated cation channels activates maxi K⁺ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:2367-71, 1994.
49. **Hoyer J**, Köhler R, Haase W, Distler A. Up-regulation of pressure-activated Ca(2+)-permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:11253-8, 1996.
50. **Humphreys BD**, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 176:85-97, 2010.
51. **Ina K**, Kitamura H, Tatsukawa S, Takayama T, Fujikura Y, Shimada T. Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Med Electron Microsc*. 35:87-95, 2002.

52. **Ishii TM**, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:11651-11656, 1997.
53. **Iwano M**, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 110:341-350, 2002.
54. **Jager H**, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S. Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol*. 65:630-638, 2004.
55. **Jensen BS**, Strøbæk D, Christophersen P, Jørgensen TD, Hansen C, Silahdaroglu A, Olesen SP, Ahring PK. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel. *Am J Physiol Cell Physiol*. 275:C848-C856, 1998.
56. **Jensen BS**, Odum N, Jørgensen NK, Christophersen P, Olesen SP. Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:10917-21, 1999.
57. **Kaczorowski GJ**, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, Garcia ML. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr*. 28:255-67, 1996.
58. **Kalluri R**, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 112:1776-1784, 2003.
59. **Kamouchi M**, Droogmans G, Nilius B. Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca^{2+} concentration in agonist-activated endothelial cells. *Gen Physiol Biophys*. 18:199-208, 1999.

60. **Khanna R**, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 274:14838-14849, 1999.
61. **Kitao A**, Sato Y, Sawada-Kitamura S, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, Honda M, Matsui O, Nakanuma Y. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. *Am J Pathol.* 175:616-626, 2009.
62. **Klahr S**, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F861-875, 2002.
63. **Klahr S**, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: the role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor. *Kidney Int Suppl.* 87:S105-112, 2003.
64. **Köhler M**, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science.* 273:1709-14, 1996.
65. **Köhler R**, Degenhardt C, Kühn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. Expression and function of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in human mesenteric artery. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res.* 87:496-503, 2000.
66. **Köhler R**, Brakemeier S, Kühn M, Behrens C, Real R, Degenhardt C, Orzechowski HD, Pries AR, Paul M, Hoyer J. Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ Res.* 89:174-179, 2001.

67. **Köhler R**, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kämpfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation*. 108:1119-1125, 2003.
68. **Köhler R**, Eichler I, Schönfelder H, Grgic I, Heinau P, Si H, Hoyer J. Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. *Kidney Int*. 67:2280-7, 2005.
69. **Kohn EC**, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA. Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:1307-11, 1995.
70. **Kouwenhoven EA**, Stein-Oakley AN, Maguire JA, Jablonski P, de Bruin RW, Thomson NM. Increased expression of basic fibroblast growth factor during chronic rejection in intestinal transplants is associated with macrophage infiltrates. *Transpl Int*. 12:42-9, 1999.
71. **Koziolk MJ**, Müller GA, Zapf A, Patschan D, Schmid H, Cohen CD, Koschnick S, Vasko R, Bramlage C, Strutz F. Role of CX3C-chemokine CX3C-L/fractalkine expression in a model of slowly progressive renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. PMID 19934081, 2009.
72. **Kriz W**. The pathogenesis of “classic” focal segmental glomerulosclerosis – lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant*. 18:vi39-vi44, 2003.

73. **Kriz W**, Hähnel B, Hosser H, Ostendorf T, Gaertner S, Kränzlin B, Gretz N, Shimizu F, Floege J. Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 14:1904-1926, 2003.
74. **Kriz W**, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal-models. *Kidney Int.* 67:404-19, 2005.
75. **Lang H**, Fekete DM. Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. *Dev Biol.* 234:120-37, 2001.
76. **Latorre R**, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 51:385-399, 1989.
77. **Le Hir M**, Hegyi I, Cueni-Loffing D, Loffing J, Kaissling B. Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem Cell Biol.* 123:335-46, 2005.
78. **Li J**, Deane JA, Campanale NV, Bertram JF, Ricardo SD. The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. *Stem Cells.* 25:697-706, 2007.
79. **Li T**, Surendran K, Zawaideh MA, Mathew S, Hruska KA. Bone morphogenic protein-7: a novel treatment for chronic renal and bone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13:417-422, 2004.
80. **Lin SL**, KisselevaT, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* 173:1617-27, 2008.

81. **Liu Y.** Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol.* 15:1-12, 2004.
82. **Lu M, Wang W.** Two types of K⁺ channels are present in the apical membrane of the thick ascending limb of the mouse kidney. *Kidney Blood Press Res.* 23:75-82, 2000.
83. **Maier T, Grgic I, Busch C, Hoyer J, Köhler R.** Endothelial ion channels – novel targets for antihypertensive therapy. *Dtsch Med Wochenschr.* 130:2637-9, 2005.
84. **Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR.** Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science.* 173:548-50, 1971.
85. **McManus OB, Harris GH, Giangiacomo KM, Feigenbaum P, Reuben JP, Addy ME, Burka JF, Kaczorowski GJ, Garcia ML.** An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry.* 32:6128-6133, 1993.
86. **McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, Leonard RJ.** Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron.* 14:645-650, 1995.
87. **Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M.** Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* 313:316-8, 1985.

88. **Müller GA**, Rodemann HP. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 17:680-3, 1991.
89. **Neilson EG**. Mechanisms of disease: Fibroblasts – a new look at an old problem. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2:101-108, 2006.
90. **Nilius B**, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 81:1415-1459, 2001.
91. **Neylon CB**. Potassium channels and vascular proliferation. *Vascul Pharmacol.* 38:35-41, 2002.
92. **Ouadid-Ahidouch H**, Roudbaraki M, Ahidouch A, Delcourt P, Prevarskaya N. Functional and molecular identification of intermediate-conductance $\text{Ca}(2+)$ -activated (K^+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C125-34, 2004.
93. **Papassotiriou J**, Köhler R, Prenen J, Krause H, Akbar M, Eggermont J, Paul M, Distler A, Nilius B, Hoyer J. Endothelial $\text{K}(+)$ channel lacks the $\text{Ca}(2+)$ sensitivity-regulating beta subunit. *FASEB J.* 14:885-94, 2000.
94. **Pat B**, Yang T, Kong C, Watters D, Johnson DW, Gobe G. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney Int.* 67:931-943, 2005.

95. **Peña TL**, Rane SG. The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *J Membr Biol.* 172:249-257, 1999.
96. **Peña TL**, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK up-regulation of the fibroblast K_{Ca} Channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J Biol Chem.* 275:13677-13682, 2000.
97. **Pluznick JL**, Sansom SC. BK channels in the kidney: role in K⁺ secretion and localization of molecular components. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291:F517-F529, 2006.
98. **Poulsom R**, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 195:229-35, 2001.
99. **Powell DW**, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 277:183-201, 1999.
100. **Qi W**, Chen X, Poronnik P, Pollock CA. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1-5, 2006.
101. **Rane SG**. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 269:457-463, 2000.

102. **Rauer H**, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca^{2+} -activated over voltage-gated K^{+} channels. *J Biol Chem.* 275:1201-1208, 2000.
103. **Roberts IS**, Burrows C, Shanks JH, Venning M, Mc William LJ. Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol.* 50:123-127, 1997.
104. **Ross R**, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. IV. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol.* 44:645-654, 1970.
105. **Roufosse C**, Bou-Gharios G, Prodromidi E, Alexakis C, Jeffery R, Khan S, Otto WR, Alter J, Poulsom R, Cook HT. Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 17:775-782, 2006.
106. **Rufo PA**, Jiang L, Moe SJ, Brugnara C, Alper SL, Lencer WI. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits Cl^{-} secretion by polarized monolayers of human colonic epithelial cells. *J Clin Invest.* 98:2066-2075, 1996.
107. **Sadlier DM**, Connolly SB, Kieran NE, Roxburgh S, Brazil DP, Kairaitis L, Wang Y, Harris CH, Doran P, Brady HR. Sequential extracellular matrix-focused and baited-global cluster analysis of serial transcriptomic profiles identifies candidate modulators of renal tubulointerstitial fibrosis in murine Adriamycin-induced nephropathy. *J Biol Chem.* 279:29670-29680, 2004.

108. **Saito T**, Fujiwara Y, Fujiwara R, Hasegawa H, Kibira S, Miura H, Miura M. Role of augmented expression of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in postischaemic heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29:324-329, 2002.
109. **Sappino AP**, Masouyé I, Saurat JH, Gabbiani G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol*. 137:585-91, 1990.
110. **Schilling T**, Stock C, Schwab A, Eder C. Functional importance of Ca^{2+} -activated K^{+} channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci*. 19:1469-1474, 2004.
111. **Schreiber M**, Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*. 73:1355-1363, 1997.
112. **Schwab A**, Wojnowski L, Gabriel K, Oberleithner H. Oscillating activity of a (Ca^{2+}) -sensitive K^{+} channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest*. 93:1631-1636, 1994.
113. **Schwab A**, Wulf A, Schulz C, Kessler W, Nechyporuk-Zloy W, Römer M, Reinhardt J, Weinhold D, Dieterich P, Stock C, Hebert SC. Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol*. 206:86-94, 2006.
114. **Sheng JZ**, Braun AP. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293:C458-67, 2007.

115. **Shepherd MC**, Duffy SM, Harris T, Cruse G, Schuliga M, Brightling CE, Neylon CB, Bradding P, Stewart AG. KCa_{3.1} Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human airway smooth muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37: 525-31, 2007.
116. **Si H**, Grgic I, Heyken WT, Maier T, Hoyer J, Reusch HP, Köhler R. Mitogenic modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 148:909-917, 2006.
117. **Silbernagel S**, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. *Thieme Verlag.* 5. Auflage, 2001.
118. **Stockbridge LL**, French AS. Characterization of a calcium-activated potassium channel in human fibroblasts. *Can J Physiol Pharmacol.* 67:1300-7, 1989.
119. **Strutz F**, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 130:393-405, 1995.
120. **Strutz F**, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Müller GA. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 57:1521-1538, 2000.
121. **Strutz F**, Renziehausen A, Dietrich M, Amin J, Becker V, Heeg M, Rastaldi MP, Müller GA. Cortical fibroblast culture from human biopsies. *J Nephrol.* 14:190-7, 2001.
122. **Strutz F**, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten Cees, Müller GA. TGF- β induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int.* 59:579-592, 2001.

123. **Strutz F**, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG, Renziehausen A, Sisic Z. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-to-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 61:1714-1728, 2002.
124. **Strutz F**, Neilson EG. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol.* 24:459-76, 2003.
125. **Strutz F**, Müller GA. Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant.* 21:3368-3370, 2006.
126. **Strutz F**, Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 17:2992-2998, 2006.
127. **Sugimoto H**, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes.* 56:1825-33, 2007.
128. **Tacconi S**, Carletti R, Bunnemann B, Plumpton C, Merlo Pich E, Terstappen GC. Distribution of the messenger RNA for the small conductance calcium-activated potassium channel SK3 in the adult rat brain and correlation with immunoreactivity. *Neuroscience.* 102:209-15, 2001.
129. **Tanaka Y**, Meera P, Song M, Knaus HG, Toro L. Molecular constituents of maxi KCa channels in smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J Physiol.* 502:545-557, 1997.

130. **Tharp DL**, Wamhoff BR, Wulff H, Raman G, Cheong A, Bowles DK. Local delivery of the KCa3.1 blocker, TRAM-34, prevents acute angioplasty-induced coronary smooth muscle phenotypic modulation and limits stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1084-1089, 2008.
131. **Thompson-Vest N**, Shimizu Y, Hunne B, Furness JB. The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat.* 208:219-29, 2006.
132. **Tian YC**, Phillips AO. TGF- β 1-mediated inhibition of HK-2 cell migration. *J Am Soc Nephrol.* 14:631-640, 2003.
133. **Tomasek JJ**, Gabbiani G, Hinz B, Chapponier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:349-63, 2002.
134. **Toyama K**, Wulff H, Chandy KG, Azam P, Raman G, Saito T, Fujiwara Y, Mattson DL, Das S, Melvin JE, Pratt PF, Hatoum OA, Gutterman DD, Harder DR, Miura H. The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherosclerosis in mice and humans. *J Clin Invest.* 118:3025-3037, 2008.
135. **Vergara C**, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol.* 8:321-329, 1998.
136. **Wang YJ**, Sung RJ, Lin MW, Wu SN. Contribution of BK(Ca)-channel activity in human cardiac fibroblasts to electrical coupling of cardiomyocytes-fibroblasts. *J Membr Biol.* 213:175-185, 2006.

- 137. Wang ZH**, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ, Wang YZ. Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+)-activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene*. 26:5107-5114, 2007.
- 138. Wiecha J**, Münz B, Wu Y, Noll T, Tillmanns H, Waldecker B. Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor. *J Vasc Res*. 35:363-71, 1998.
- 139. Wiggins R**, Goyal M, Merritt S, Killen PD. Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody-induced crescentic nephritis in the rabbit. A cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Lab Invest*. 68:557-565, 1993.
- 140. Wulff H**, Miller MJ, Hänsel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:8151-8156, 2000.
- 141. Wulff H**, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem*. 276:32040-32045, 2001.
- 142. Wulff H**, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM, Shakkottai V. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem*. 14:1437-57, 2007.

143. **Wynn TA.** Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 117:524-529, 2007.
144. **Yamashita S, Maeshima A, Nojima Y.** Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 16:2044-2051, 2005.
145. **Yang J, Liu Y.** Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 13:96-107, 2002.
146. **Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y.** Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest.* 110:1525-1538, 2002.
147. **Yang J, Zhang X, Li Y, Liu Y.** Downregulation of Smad Transcriptional Corepressors SnoN and Ski in fibrotic kidney: an amplification mechanism for TGF- β 1 signaling. *J Am Soc Nephrol.* 14:3167-3177, 2003.
148. **Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY.** Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependant and -independent Smad pathways: the role of Smad 3. *Hypertension.* 54:877-84, 2009.
149. **Zeisberg M, Strutz F, Müller GA.** Role of fibroblast activation in Inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol.* 13:S111-20, 2000.
150. **Zeisberg M, Strutz F, Müller GA.** Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10:315-20, 2001.

151. **Zeisberg M**, Hanai JI, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 9:964-968, 2003.

152. **Zeisberg M**, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidneys. *J Biol Chem.* 280:8094-100, 2005.

153. **Zeisberg M**, Soubasakos MA, Kalluri R. Animal models of renal fibrosis. *Methods Mol Med.* 117:261-272, 2005.

154. **Zeisberg EM**, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 19:2246-8, 2008.

155. **Zhang G**, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol.* 3:308-318, 1995.

7 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/-INNEN

Meine Akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren an der
Philipps-Universität Marburg:

Barth

Basler

Baum

Bauer

Becker

Biens

Cetin

Czubayko

Daut

Elsässer

Görg

Hofmann

Hoyer

Jungclas

Kircher

Klose

König

Koolmann

Kühnert

Kuhlmann

Lill

Löffler

Lohoff

Maier

Maisch

Moll

Moosdorf

Mueller
Neubauer
Oertel
Pagenstecher
Plant
Renz
Ritter
Röhm
Rothmund
Schäfer
Schmidt
Seitz
Steiniger
Suske
Vogelmeier
Wagner
Werner
Westermann
Weihe
Wulf

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren an der
Ludwig-Maximilians-Universität München:

Anders
Angele
Angstwurm
Arnhold
Behr
Bender
Bergner
Beuschlein
Boekstegers

Bogner
Braess
Brand
Briegel
Bruns
Christ
Diepolder
Dieterich
Dörfler
Dreyling
Dürr
Feddersen
Fischer
Fischereder
Franz
Gärtner
Gerbes
Graeb
Gülberg
Häußinger
Hallfeldt
Hartl
Hatz
Hiddemann
Hoffmann
Huber
Huss
Ihrler
Jauch
Käab
Kanz
Kirchner
Klopstock
Kolligs

Kreis
Kupatt
Löhe
Löscher
Mussak
Mutschler
Noachtar
Ostermann
Parhofer
Rehm
Reincke
Rentsch
Rust
Samtleben
Sauter
Schäfer
Schewe
Schirra
Schopohl
Schnurr
Seißler
Sitter
Sodian
Spiekermann
Spitzweg
Steinbeck
Thaller
Vielhauer
Wagner
Weidenhagen
Zachoval
Zwißler

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle gebührt meinen Mentoren, Eltern und Freunden mein allergrößter Dank und Respekt, ohne die so vieles bei der Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralf Köhler möchte ich mich für die umfangreiche und angenehme Betreuung und die großzügige Bereitstellung von Labor- und Forschungsmaterialien herzlichst bedanken. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und war mir dadurch eine unersetzliche Hilfe. Danken möchte ich im Besonderen auch Herrn Prof. Dr. med. Joachim Hoyer für seine hilfreichen Anregungen zur Arbeit sowie für die Bereitstellung der Materialien. Mein ausgiebiger Dank gilt auch Herrn Dr. med. Ivica Grgic für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen und den regen Austausch. Darüber hinaus gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. med. Hermann-Josef Gröne für seine freundliche Kooperation während der Forschungstätigkeit. Herrn Dr. rer. nat. Willm Heyken, Frau Anja Müller, Herrn Brajesh Kaistha und Frau Anuradha Kaistha danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre im Labor sowie für ihre Hilfe und Anregungen. Des Weiteren möchte ich Frau Romy Weber für ihre zahlreichen medizinisch-technischen Ratschläge meinen herzlichen Dank aussprechen.

Unendlich viel zu verdanken habe ich meinen Eltern, die mir durch ihren stets liebevollen und grenzenlosen Zuspruch nicht nur moralisch bei der Erstellung der Arbeit den notwendigen Rückhalt gaben, sondern mir durch die Ermöglichung meiner schulischen und universitären Ausbildung überhaupt erst den Weg zu dieser Arbeit ebneten. Auch meinen Schwestern Marike und Claudia danke ich dabei für die moralische und bekräftigende Teilnahme an der Arbeit. Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund Eike, der mich in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit unterstützt und aufgemuntert hat und mir stets den Rücken stärkte.